



Rapport du Stage

Suivi de trajectoire de micro-algues motiles phototactiques en réponse à la lumière bleue

SUN Qimeng

Encadrant : Florence ELIAS

Rapporteur : Andrew CALLAN-JONES

22 Mai 2023 - 13 Juillet 2023

Contexte

Une technique de suivi de trajectoire 3D a été créée au laboratoire PMMH pour suivre, sur des temps très longs et en 3 dimensions, des objets fluorescents comme des colloïdes ou des bactéries. L'objectif du stage est d'étudier la réponse d'une micro-algue flagellée photosynthétique à une excitation de la lumière bleue, grâce au suivi de trajectoires de réorientation de l'algue vers la lumière (phototaxie) ou dans la direction opposée. Les micro-algues peuvent être suivies grâce à leur auto-fluorescence naturelle excitée dans le rouge, une couleur neutre pour la phototaxie. Ce stage expérimental consistera donc à mettre en place les protocoles d'observation de la trajectoire 3D du micro-organisme, et à le suivre pour analyser son comportement phototactique.

Contents

1	Introduction	3
2	Chlamydomonas	4
3	Microscope Lagrangien	5
4	Expérience	6
4.1	Dispositifs	6
4.1.1	La piscine	7
4.1.2	La lumière	7
4.2	Culture des algues	14
4.3	Protocole	15
5	Résultats	16
6	Conclusion	19
7	Annexe	21

1 Introduction

Dans le cadre de mon stage de fin d'étude à Université Paris Cité, j'ai eu une très bonne opportunité de l'intégrer et de réaliser le stage dans le laboratoire PMMH à Paris. Du 22/05/2023 au 13/07/2023, j'ai effectué le stage de recherche sur Suivi de trajectoire de micro-algues motiles phototactiques en réponse à la lumière bleue.

Le Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes (PMMH, UMR 7636) est une unité de recherche expérimentale multidisciplinaire qui englobe les domaines de la mécanique des fluides et des solides (ingénierie), de la physique, de la biologie et de la chimie. Les principaux domaines de recherche du PMMH sont centrés sur la mécanique des fluides et la mécanique des solides. De nombreuses études thématiques menées au PMMH se caractérisent par le fait qu'elles utilisent des concepts issus des deux domaines scientifiques (par exemple les interactions fluide/structure, la dynamique interfaciale et le mouillage) et qu'elles explorent plus en profondeur les propriétés physiques de la matière au voisinage de la transition bloquante. Il n'est donc pas surprenant que l'activité scientifique récente ait commencé à s'orienter vers des thèmes multidisciplinaires qui font appel à des questions biophysiques et biomécaniques, comme le thème de mon stage : le comportement de détection de la lumière des microalgues et leur hydrodynamique de nage.

L'identité particulière du PMMH est basée sur un grand nombre de petites équipes ayant des interactions fortes et des collaborations étendues avec de nombreuses autres équipes ou chercheurs en France et dans le monde entier (y compris les Etats-Unis, l'Allemagne, l'Espagne, le Royaume-Uni, la Pologne, le Chili, l'Argentine, la Chine, etc.) Au cours de ce stage, j'ai rejoint l'équipe de Mmes Florence Elias et Jeanne Moscatelli, avec lesquelles j'ai travaillé dans de bonnes conditions pour mes recherches et avec le soutien de M. Thierry Darnige et M. Eric Clément.

Le laboratoire PMMH a également produit de nombreux résultats expérimentaux, comme la création d'une technique de suivi de trajectoire 3D qui permet de suivre des objets fluorescents[1], tels que des colloïdes ou des bactéries, pendant de longues périodes de temps dans l'espace 3D. Dans le cadre de ce stage, je devais utiliser cette technique pour étudier la réponse des micro-algues flagellées photosynthétiques à l'excitation de la lumière bleue en suivant les trajectoires des microalgues lorsqu'elles se réorientent vers la lumière (phototaxie) ou dans la direction opposée.

La tâche principale de mon stage était de développer un protocole d'observation des trajectoires microbiennes en trois dimensions et de suivre et d'analyser leur comportement phototactique. J'ai eu une excellente occasion de me familiariser avec la construction de projets expérimentaux, les cultures cellulaires et le traitement des images et des données, et d'améliorer mon attitude de recherche ainsi que mon autonomie expérimentale, et d'apprendre à résoudre des problèmes multidisciplinaires au cours de ce stage.

2 Chlamydomonas

Au cours de ce stage, nous avons utilisé la souche CC-124 de *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue verte unicellulaire eucaryote qui vit principalement en eau douce. Les cellules sont ovales ou rondes, avec un diamètre de 7 à 10 μm , et sont capables de nager dans leur environnement liquide grâce à leurs deux flagelles, ce qui en fait des nageurs microscopiques. La souche CC-124 est couramment utilisée pour la recherche. Le génome de cette souche a été entièrement séquencé, ce qui permet aux chercheurs de mieux comprendre la fonction de ses gènes et comment ces gènes influencent ses caractéristiques physiologiques et comportementales.

Le mouvement de ses flagelles est un sujet d'étude très populaire. Les flagelles sont des appendices cellulaires en forme de poils qui peuvent se déformer, et les flagelles des micro-organismes eucaryotes sont flexibles et capables de changer de forme activement[2]. *Chlamydomonas reinhardtii* a deux flagelles de longueur égale, qui agissent ensemble pour permettre à la cellule de l'algue de nager dans l'eau. Elle effectue une sorte de brasse : ses deux flagelles s'éloignent l'un de l'autre lors d'une phase de puissance, puis se rapprochent lors d'une phase de récupération, permettant à la cellule de se propulser à un rythme similaire à une nage très rapide (des dizaines de fois par seconde)[3]. Le mouvement des flagelles de *Chlamydomonas reinhardtii* peut prendre plusieurs formes, notamment le battement parallèle et la nage en rotation. En mode battement parallèle, les deux flagelles battent de façon synchrone pour faire avancer la cellule de l'algue. En mode nage en rotation, les deux flagelles battent alternativement rapidement et lentement, faisant tourner la cellule de l'algue. L'observation au microscope, combinée à l'analyse d'image et au suivi des particules, montre que *Chlamydomonas* effectue une marche aléatoire persistante à une vitesse d'environ 100 micromètres par seconde (dix fois sa taille). Environ toutes les cinq secondes (durée de persistance) et en absence de lumière, *Chlamydomonas* change de direction au hasard[3].

Chlamydomonas reinhardtii possède un "œil" sur le côté de la cellule. C'est un photorécepteur, l'œil le plus simple du monde biologique. Une fois que cet œil reçoit un signal lumineux, une cascade de réactions biochimiques se produit à l'intérieur de la cellule, induisant un changement dans le battement des flagelles, ce qui conduit finalement à la réorientation de l'algue vers la source de lumière. Ainsi, ce "capteur photosensible" permet à *Chlamydomonas* de nager vers une source de lumière. Cette caractéristique, appelée phototaxie positive, permet à la cellule de se déplacer vers la zone la plus propice à la photosynthèse diurne. Au contraire, tout comme les humains évitent l'exposition prolongée au soleil par crainte des brûlures, les algues s'éloignent également des sources lumineuses lorsque leur intensité est trop forte, manifestant ainsi une phototaxie négative. Ainsi, la nage aléatoire en absence de lumière devient dirigée en présence de lumière.[3]

La phototaxie de *Chlamydomonas reinhardtii*, c'est-à-dire sa réaction à la lumière, a fait l'objet de nombreuses études. Ce mécanisme offre à ces microalgues la capacité de s'ajuster et de rechercher activement des conditions lumineuses optimales, leur permettant de maximiser leur efficacité photosynthétique. Toutefois, si nous avons une compréhension étoffée de la réaction de *Chlamydomonas reinhardtii* à la lumière au niveau collectif, les mécanismes spécifiques à l'échelle cellulaire demeurent moins explorés.

Devant ce constat, notre approche s'est résolument orientée vers l'étude à l'échelle cellulaire, nous offrant ainsi une perspective plus détaillée et précise. Cette focalisation nous permet de mieux appréhender les trajectoires individuelles de ces algues lors de leur réorientation en réponse à la lumière.

Quant au type de lumière, nous optons pour une source monochromatique. Bien que les chlamydomonas soient insensibles à la lumière rouge, elles réagissent aux longueurs d'onde inférieures à 630 nm. La lumière bleue semble donc être le choix judicieux pour induire leur phototaxie.

Dans ce cadre, notre recherche se consacre à la compréhension de la phototaxie de Chlamydomonas reinhardtii sous lumière bleue. Cette initiative, audacieuse et innovante, cherche notamment à déchiffrer la réaction singulière de l'algue à cette lumière, un aspect encore méconnu. Par cette étude, nous aspirons à enrichir les connaissances actuelles et à établir un fondement robuste pour les futures recherches dans ce secteur.

3 Microscope Lagrangien

Le laboratoire PMMH a créé une technique de suivi en 3D qui peut être mise en œuvre à l'aide d'un équipement de laboratoire courant. La configuration se compose d'une platine à commande mécanique x,y avec des actionneurs piézoélectriques z, d'une caméra CCD photosensible, d'un générateur de déclenchement TTL de National Instrument et d'un PC standard exécutant un programme Labview. Nous appelons cet Instruments scientifiques un microscope Lagrangien. La microscopie lagrangienne contrôle la platine du microscope pour suivre les micronageurs. Il est particulièrement adaptée au suivi précis de particules fluorescentes ou de micro-organismes mobiles sur de longues distances dans des dispositifs microfluidiques avec ou sans écoulement au niveau microscopique. Cela nous a permis de suivre la trajectoire d'algues individuelles en 3D sur une période de temps relativement longue (environ 10 minutes). Le système de suivi est comme le montre la figure ci-dessous.(Figure 1)

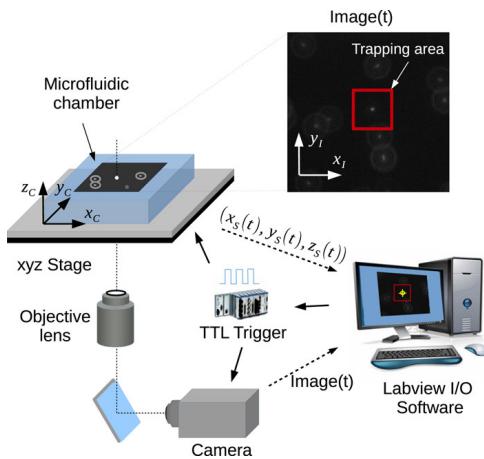


Figure 1: Montage du microscope Lagrangien[1]

Le système de suivi se compose de deux platines superposées montées sur un microscope inversé. Les positions horizontales x et y sont contrôlées mécaniquement et la position z est contrôlée par un actionneur piézoélectrique. Une caméra CCD est utilisée pour visualiser les particules fluorescentes cibles dans la "zone de capture". La platine et la caméra sont déclenchées par un module de déclenchement TTL de National Instrument pour synchroniser l'acquisition de l'image et le déplacement de la platine. Les images sont transférées à un programme Labview qui traite les informations. Le programme enregistre le positionnement x, y et z actuel et ordonne à la platine mécanique et piézoélectrique de se déplacer vers une nouvelle position, par exemple pour maintenir la particule à proximité de la "zone de capture" et faire la mise au point. Enfin, nous obtenons un enregistrement des positions x, y et z et une vidéo de la particule dans son environnement pendant le suivi lagrangien.[1]

L'instrument de suivi lagrangien que nous utilisons garantit une précision de positionnement inférieure au micron, tout en opérant à des fréquences d'acquisition atteignant près de 80 Hz. Dans un contexte de flux, cet instrument peut suivre des particules se déplaçant à des vitesses allant jusqu'à $160 \mu\text{m/s}$ en déplacement horizontal et $40 \mu\text{m/s}$ en déplacement vertical.[1] Notamment, la vitesse à laquelle se déplace Chlamydomonas reinhardtii avoisine les $100 \mu\text{m/s}$ [3], se situant ainsi parfaitement dans les capacités de notre microscope lagrangien.

Dans le cadre de notre expérience, pour suivre les Chlamydomonas reinhardtii avec le microscope Lagrangien, il est impératif de les rendre fluorescentes. Les cellules de Chlamydomonas reinhardtii possèdent naturellement des pigments de chlorophylle a et b, ainsi qu'un riche contenu mitochondrial. Ces caractéristiques confèrent à Chlamydomonas reinhardtii une capacité d'autofluorescence. Ainsi, ces microalgues émettent une fluorescence dans les spectres du rouge, du rouge lointain et de l'infrarouge.[4] Pour exploiter cette propriété dans nos expérimentations, nous utilisons une source lumineuse rouge afin d'exciter l'autofluorescence des algues, permettant ainsi à notre microscope Lagrangien de les suivre efficacement. De plus, comme indiqué dans la section précédente, les algues ne sont pas sensibles à la lumière rouge, nous pouvons donc les observer sans provoquer de réponse phototactique.

Pour assurer que la source lumineuse utilisée émet bien dans le rouge, nous utilisons le dispositif à semi-conducteurs Colibri 5/7 de ZEISS. Cet équipement est doté de LED qui émettent dans le rouge à une longueur d'onde de 630 nm. En complément, nous utilisons le jeu de filtres 90 HE LED, permettant le passage de la lumière entre 659 nm et 759 nm. Ainsi, le microscope ne capte que la fluorescence rouge naturellement produite par les algues, sans être perturbé par d'autres sources lumineuses.

4 Expérience

4.1 Dispositifs

Dans l'expérience, nous avons besoin de nombreux dispositifs. En plus du microscope de Lagrangien que nous avons mentionné précédemment, nous avons également besoin

d'une piscine pour contenir les algues et d'une source de lumière bleue.

4.1.1 La piscine

Afin de mieux observer la réaction des algues à l'exposition à la lumière, nous avons choisi de placer les algues dans une piscine. Cette piscine est en réalité une structure circulaire de 10 mm de diamètre et de 210 μm de profondeur, ayant un volume d'environ 17 ml. Cette configuration permet à la lumière rouge d'éclairer uniformément l'ensemble de la piscine.

Pour fabriquer la piscine, nous perçons des petits trous dans un scotch double face de l'épaisseur connue, en utilisant un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Ensuite, nous découpons le scotch troué en petits carrés de la largeur appropriée avec un ciseau. Chacun de ces petits carrés est ce que nous appelons une "piscine".

Dans le cadre de l'expérience, nous avons fixé la piscine sur une lame de verre. Ensuite, grâce à une micropipette - spécifiquement un PIPETMAN - nous avons soigneusement placé 17 ml de la suspension d'algues à l'intérieur de la piscine. Enfin, nous avons scellé la piscine à l'aide d'une lamelle de microscope pour garantir une suspension de microalgues exempte de bulles d'air. La combinaison de la piscine et de la lame de verre sera positionnée devant la source de lumière bleue, comme illustré dans la Figure 2 ci-dessous.

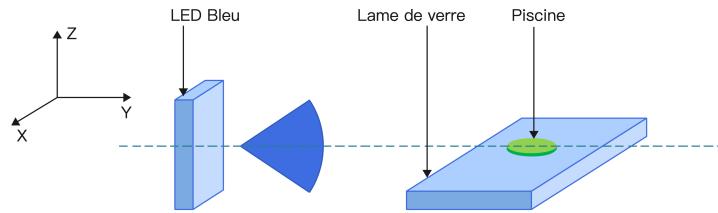


Figure 2: Montage de l'expérience

4.1.2 La lumière

Au cours de l'expérience, nous utilisons une LED bleue issue d'une bande de LEDs RGB comme source de lumière bleue. Cette LED est encapsulée dans un boîtier en plastique d'une longueur d'environ 3,50 mm et d'une largeur d'environ 2,00 mm. Pour vérifier que la couleur de cette source lumineuse est bien bleue, nous avons employé un spectromètre pour mesurer sa longueur d'onde. Voici le montage de la mesure.(Figure 3)

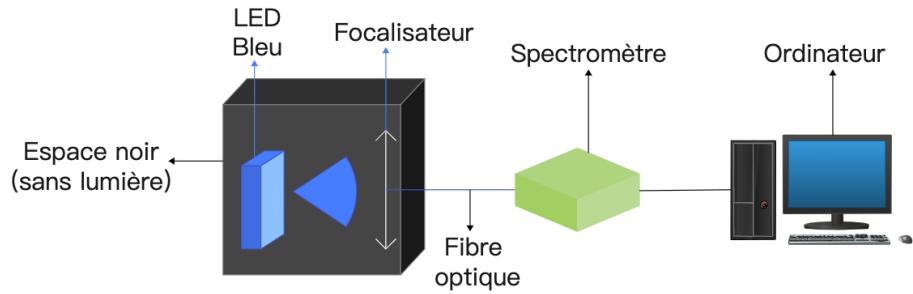


Figure 3: Montage de la mesure de la longueur d'onde d'une source lumineuse

Selon la figure, il est clair que pour déterminer la longueur d'onde de la source lumineuse, nous devons situer la source lumineuse à tester dans un espace dépourvu de lumière. Dans cet espace noir, nous utilisons un focalisateur pour converger la lumière diffuse en une source lumineuse ponctuelle. Cette lumière est ensuite transmise au spectromètre via une fibre optique. Le spectromètre à fibre optique que nous utilisons est le modèle USB4000 de la marque Ocean Optics. Voici une illustration de son principe de fonctionnement.(Figure 4)

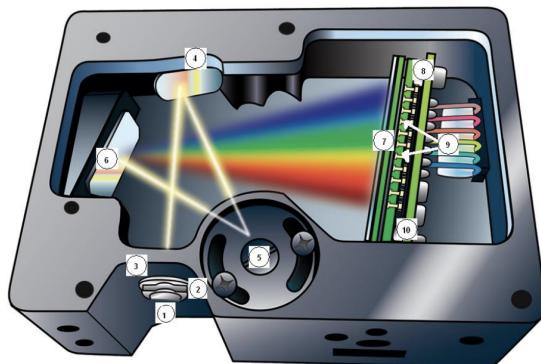


Figure 4: Spectromètre USB4000 avec composants[5]

La figure nous indique que l'utilisation d'une fibre optique permet d'amener la lumière jusqu'à l'entrée du spectromètre, où elle est ensuite introduite. L'élément clé du spectromètre est un réseau de diffraction, qui est un élément optique précis fonctionnant de manière analogue à un prisme. Il décompose la lumière incidente en ses différentes couleurs constitutives, formant ainsi un spectre, à l'image d'un arc-en-ciel. Suite à cette décomposition, la lumière est guidée vers un détecteur qui mesure l'intensité de chaque couleur de lumière. Ces informations sont ensuite converties en signaux électriques. Ces signaux électriques sont transmis à un convertisseur analogique-numérique, qui transforme les signaux analogiques en signaux numériques. Enfin, ces signaux numériques

sont transmis à un ordinateur pour être traités et analysés. Nous avons recueilli 20 ensembles de données distincts, dont nous avons calculé la moyenne.[5]

Par la suite, nous avons tracé un graphique représentant l'intensité de la LED en fonction de la longueur d'onde. L'intensité est exprimée en unités arbitraires, tandis que la longueur d'onde est en nanomètres. Le graphique obtenu est présenté ci-dessous.(Figure 5)

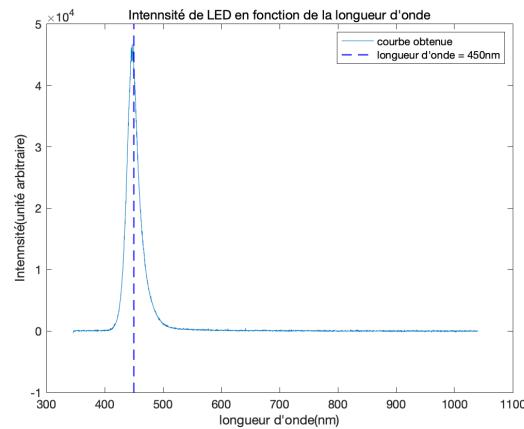


Figure 5: Intensité de LED en fonction de la longueur d'onde

En observant le graphique, nous constatons que le pic d'intensité lumineuse se situe bien à 450 nm. Cette longueur d'onde correspond exactement à la couleur bleue. Par conséquent, nous pouvons affirmer que nous utilisons une source lumineuse bleue.

En outre, étant donné que la source lumineuse LED bleue que nous utilisons est divergente, il est également nécessaire de déterminer son champ d'intensité lumineuse à la position de la piscine sous le microscope. Notre expérimentation se focalisant sur les réactions des algues dans le plan (x, y), nous avons élaboré une expérience spécifique pour mesurer la variation de la source lumineuse bleue dans les directions x et y .

Nous avons commencé par supposer que la source lumineuse bleue présente une distribution gaussienne dans la direction x et une distribution linéaire dans la direction y (distance entre le LED et l'écran - voir Figure 6). Sur cette base, nous avons pu dériver une formule relative à l'intensité lumineuse :

$$I(x, y) = I_1(y) e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma(y)^2}} \quad (1)$$

Ensuite, pour vérifier la précision de cette formule, nous mettons en œuvre la configuration expérimentale dépeinte dans la figure ci-dessous.(Figure 6)

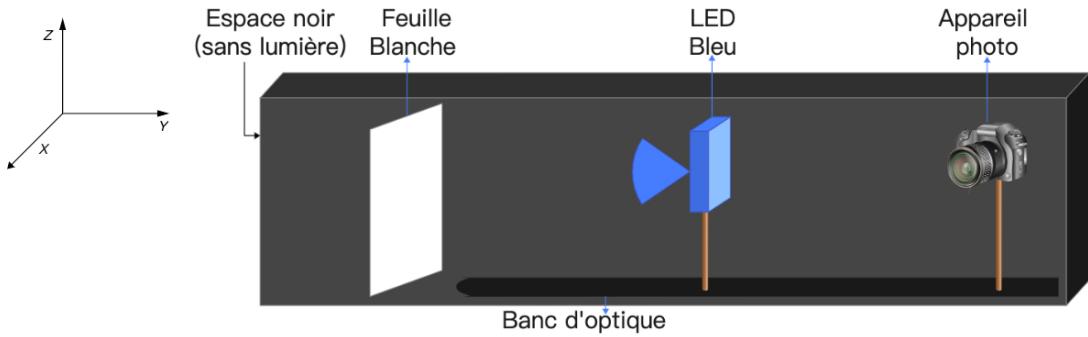


Figure 6: Montage pour la mesure de la distribution d'intensité lumineuse d'une source lumineuse

Dans l'espace noir, nous fixons la source de lumière LED bleue et l'appareil photo sur le même banc optique, c'est-à-dire que les deux sont alignés sur le même axe y. Nous positionnons ensuite une feuille blanche quadrillée en face de la LED bleue, de manière perpendiculaire au banc optique, c'est-à-dire dans le plan (x, z). Nous ajustons les paramètres de l'appareil photo, comme l'ouverture, la sensibilité ISO et la vitesse d'obturation. En commençant par la position où la LED bleue est complètement accolée à la feuille blanche, nous reculons par paliers de 5 mm et utilisons l'appareil photo pour capturer les taches lumineuses qui apparaissent sur la feuille blanche quadrillée à chaque étape. Étant donné l'espace limité sur la platine du microscope Lagrangien, il suffit de mesurer jusqu'à ce que la distance entre la feuille blanche et la LED bleue atteigne un maximum de 50 mm.

Après avoir obtenu 11 photographies, nous devons les traiter à l'aide du logiciel ImageJ. D'abord, lors de l'importation des photos, nous utilisons la fonction "Image Sequence" pour fusionner plusieurs images en une pile d'images. Ensuite, nous définissons le type d'image comme étant une image en niveaux de gris de 8 bits, permettant ainsi la conversion des images en couleur capturées en images en noir et blanc. Nous utilisons par la suite l'outil "Line Segment" pour tracer une ligne à travers le centre de la tache, en veillant à ajuster les points de départ et d'arrivée de la ligne pour garantir qu'elle passe horizontalement par le centre de la tache dans chaque photo. Ensuite, nous utilisons la fonction "Set Scale" pour convertir la distance en pixels de la ligne tracée en distance réelle, en nous basant sur la grille présente sur la feuille blanche pour estimer cette distance réelle. Finalement, nous utilisons la fonction "Plot Profile" pour tracer un graphique de l'intensité en niveaux de gris de nos segments de ligne, et nous enregistrons ces données dans un fichier. Par la suite, nous utiliserons Python pour traiter ces données afin d'analyser et de comprendre les variations d'intensité lumineuse de la source lumineuse bleue. Le programme python est en Annexe1.

Nous utilisons Python pour générer un graphique de l'intensité en niveaux de gris, où l'axe des x représente la position du segment de ligne et l'axe des y les niveaux de gris. Pour vérifier si l'intensité lumineuse suit une distribution gaussienne dans la direction x, nous utilisons la fonction optimise.curve_fit de la librairie scipy pour "fit" les données et

tracer la courbe correspondante. Dans ce contexte, nous choisissons l'équation 1 comme fonction à fit. Le graphique ci-dessous représente l'intensité en niveaux de gris lorsque la distance entre la LED bleue et la feuille blanche est de 40 mm.(Figure 7)

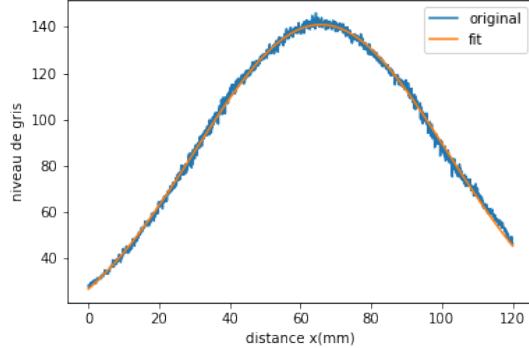


Figure 7: Graphique de l'intensité en niveaux de gris lorsque la LED est située à la distance $y=40$ mm de l'écran.

En observant la figure, nous constatons que la courbe d'origine et la courbe fit se superposent parfaitement. Cela valide notre hypothèse selon laquelle la source lumineuse suit une distribution gaussienne dans la direction x . Pour vérifier la distribution linéaire dans la direction y , nous traçons la valeur de $I_1(y)$ et σ , obtenues à chaque fit, en fonction de la distance correspondante entre la feuille blanche et la source lumineuse. La figure ci-dessous illustre les résultats que nous avons obtenus.(Figure 8 et Figure 9) Les programmes python sont en Annexe2 et Annexe3.

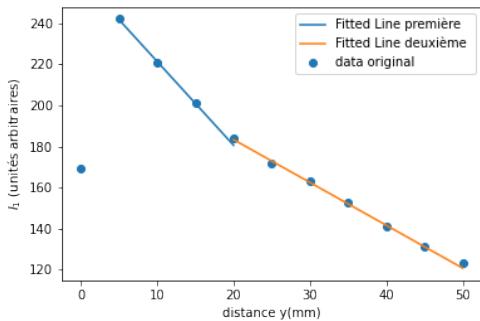


Figure 8: I_1 en fonction de la distance y

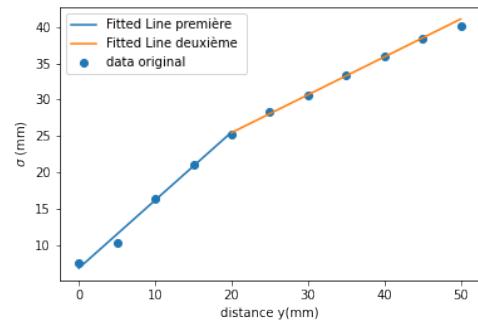


Figure 9: σ en fonction de la distance y

En examinant la figure, nous constatons que la courbe obtenue par le fit coïncide parfaitement avec les points d'origine. Cependant, les graphiques des figures 8 et 9 présentent deux segments de ligne distincts. La distance entre la "piscine" et la source lumineuse dans l'expérience varie de 30 à 50 mm, rendant ainsi la seconde partie plus pertinente pour notre étude. Nous pouvons donc également affirmer que la source lumineuse suit une distribution linéaire dans la direction y .

Pour obtenir la solution analytique de l'équation 1, nous devons également déterminer la valeur moyenne x_0 . Nous traçons également la valeur de x_0 obtenue à chaque fit en

fonction de la distance correspondante entre la feuille blanche et la source lumineuse. La figure ci-dessous illustre le graphique que nous avons tracé.(Figure 10) Le programme python est en Annexe4.

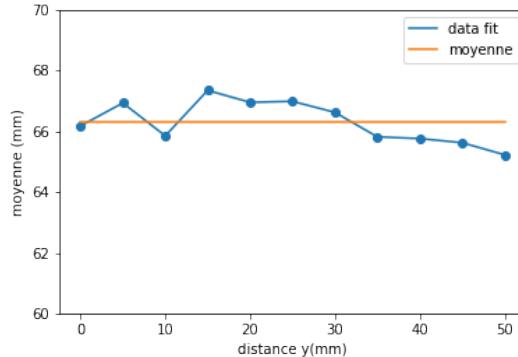


Figure 10: x_0 en fonction de la distance y

En examinant le graphique, nous observons que les valeurs de x_0 à différentes distances présentent peu de variation, et la ligne droite jaune représente leur valeur moyenne. Par conséquent, nous pouvons conclure que la valeur de x_0 dans l'équation 1 est $66,29 \pm 0,66$ mm. De la même façon, nous pouvons obtenir les expressions de $I_1(y)$ et $\sigma(y)$. Les formules correspondantes sont présentées ci-dessous.

$$I_1(y) = -2.09y + 225.08 \quad (2)$$

$$\sigma(y) = 0.52 * y + 15.04 \quad (3)$$

En substituant les équations 2 et 3 dans l'équation 1, nous obtenons l'expression complète :

$$I(x, y) = (-2.09y + 225.08) \exp\left(-\frac{(x - 66.29)^2}{2(0.52y + 15.04)^2}\right) \text{ avec } x, y \text{ en mm} \quad (4)$$

D'après l'équation 4 obtenue, nous pouvons tracer la carte lumineuse de la source lumineuse LED bleue. Cependant, pour une meilleure compréhension, nous devons convertir le niveau de gris en intensité lumineuse. À cette fin, nous avons conçu une expérience, dont le montage est illustré dans la figure ci-dessous.(Figure 11)

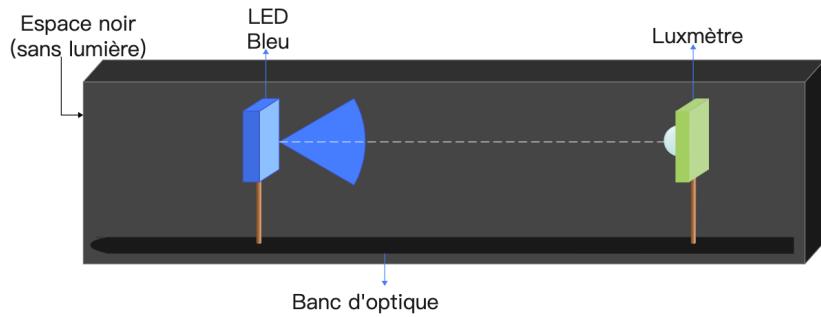


Figure 11: Montage de mesure d'intensité lumineuse pour source lumineuse

Dans l'espace noir, nous avons fixé la LED bleue et le luxmètre sur le même banc optique, et ajusté la hauteur de la LED bleue pour qu'elle soit au même niveau que le point le plus saillant de la sphère collectrice de lumière du luxmètre. Nous avons ensuite réglé la distance entre la LED bleue et le point le plus saillant de la sphère collectrice de lumière à 50 mm et mesuré l'intensité lumineuse qui était de 3,74 lux. Suite à nos calculs, lorsque x équivaut à x_0 et y à 50, la valeur en niveaux de gris est de 120,67. Nous avons ensuite incorporé le rapport des deux dans l'équation 4 pour obtenir enfin l'expression de l'intensité lumineuse de la source LED bleue dans le plan (x, y) :

$$I(x, y) = -0.065y + 6.976 \exp\left(-\frac{(x - 66.29)^2}{2(0.52y + 15.04)^2}\right) \text{ (lux)} \text{ avec } x, y \text{ en mm} \quad (5)$$

Les cartes lumineuses peuvent être créées en utilisant cette formule et la fonction `pyplot.imshow` de la bibliothèque `matplotlib`. Pour mieux représenter les conditions réelles de nos expériences, nous avons également dessiné des versions agrandies de la "piscine". Les images résultantes sont présentées ci-dessous.(Figure 12 et Figure 13) Les programmes python sont en Annexe5 et Annexe6.

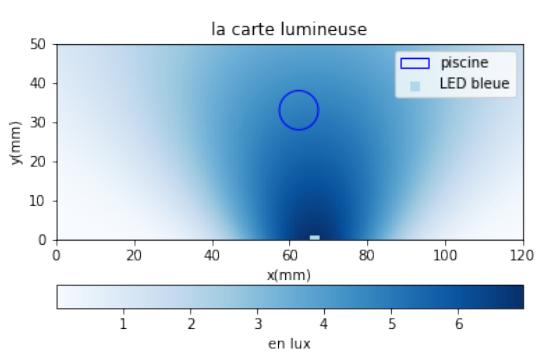


Figure 12: Graphique de l'intensité lumineuse

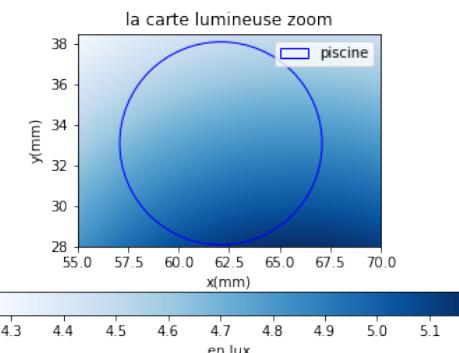


Figure 13: Graphique de l'intensité lumineuse zoom

En observant ces deux représentations, il est évident que l'intensité lumineuse présente une variation notable selon l'axe y. Cependant, à l'intérieur d'une piscine, cette intensité demeure relativement stable en direction de l'axe x.

4.2 Culture des algues

Pour cultiver des algues, nous devons tempérer la solution HSA, qui constitue le milieu de culture des algues. Parce que la solution doit être maintenue à une température comprise entre 2 et 8°C, or notre algue (*chlamydomonas cc-124*) vit à une température d'environ 22-23°C. Habituellement, les algues sont maintenues sur du gel d'agar. Avant de pouvoir les utiliser, il faut les transférer en milieu liquide, puis les faire croître quelques jours en solution. Ce processus a lieu dans un incubateur qui maintient une température constante de 23°C et respecte des cycles lumineux jour-nuit de 12h-12h. De plus, afin de prévenir la contamination croisée - soit la pollution de l'environnement par les algues et vice-versa - nous assurons la culture des algues dans une hotte biologique. Il est impératif d'assurer la stérilité de tous les instruments utilisés. Vous trouverez ci-dessous le schéma illustrant le principe de la hotte biologique (Figure 14).

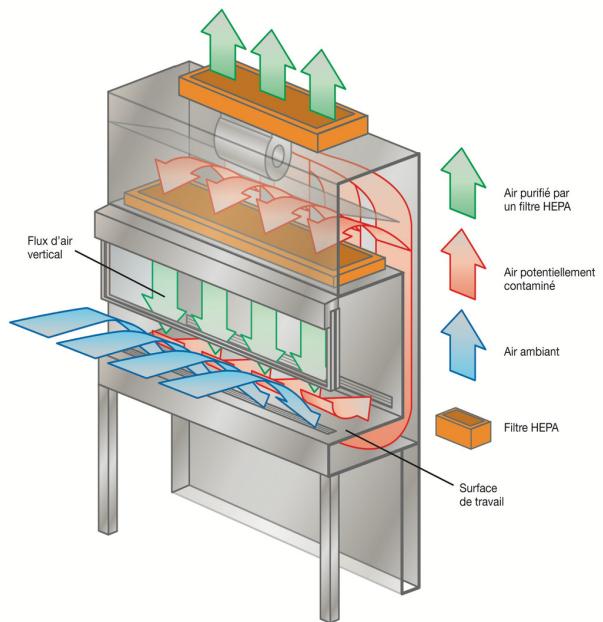


Figure 14: Schéma du principe de la hotte biologique[6]

La hotte biologique, également appelée hotte à flux laminaire vertical, est principalement utilisée pour la culture de cellules animales. Ce type de hotte protectrice empêche la contamination des matériaux manipulés et protège l'utilisateur. Sa construction de base comprend une zone de travail fermée, qui a un système de ventilation capable de créer une barrière d'air composée d'air filtré stérile - généralement par un filtre à air à haute efficacité particulaire (HEPA). Cette barrière empêche les particules présentes dans l'air d'entrer dans la zone de travail, protégeant ainsi l'intérieur de la hotte contre les polluants externes. En même temps, elle peut filtrer les particules d'aérosols qui pourraient être générées à l'intérieur de la zone de travail, évitant ainsi qu'elles ne constituent une menace pour l'opérateur et l'environnement. L'air ambiant et l'air de l'enceinte sont filtrés par le filtre HEPA avant d'être réacheminés vers l'enceinte et d'en sortir. [6]

Le protocole de culture des algues est ci-dessous.

- 1.Prendre un flacon Erlenmeyer stérile 250mL.
 - 2.Ajouter à l'aide d'une pipette jaugée 100mL de la solution HSA dans le flacon Erlenmeyer.
 - 3.Fermer soigneusement le flacon Erlenmeyer et la placer dans l'incubateur.
 - 4.Attendre au moins 4h pour revenir à une température de 23°C. La solution est prête.
 - 5.Reprendre le flacon Erlenmeyer avec la solution HSA tempérée.
 - 6.Prélevez à l'aide d'une anse d'inoculation un fragment d'algue de la boîte de Pétri contenant la culture mère et transférez-le dans le flacon Erlenmeyer.Ouvrir le couvercle supérieur du bouchon du flacon Erlenmeyer pour s'assurer qu'il y a suffisamment d'oxygène pour les algues et replacer le flacon Erlenmeyer dans l'incubateur sur un agitateur orbital.
 - 7.Attendre au moins 4 jours. Les algues sont prêtes.
- Il est à noter que la culture des algues nécessite de l'oxygène, mais en même temps, nous devons faire attention à éviter les impuretés telles que la poussière et les bactéries dans l'air. Par conséquent, nous devons ouvrir le flacon Erlenmeyer et placer un filtre avec des pores de 0.22 micromètres à l'ouverture du flacon, pour garantir que de l'oxygène propre pénètre à l'intérieur du flacon, sans que d'autres impuretés ne polluent nos algues.
- Le traitement de la solution résiduelle d'algues est tout aussi crucial que la culture des algues elles-mêmes. Lorsque la durée de culture de nos algues excède 7 jours, la solution contenue dans le flacon n'est plus exploitable. Il est alors nécessaire de neutraliser toutes les algues en utilisant de l'eau de javel avant de verser cette solution traitée dans un bidon jaune. Par la suite, nettoyez le flacon Erlenmeyer avec de l'eau et du savon. Une fois nettoyé, rincez-le entièrement à l'aide d'eau ultra-pure provenant d'un déminéralisateur, puis laissez-le sécher à l'air libre.

4.3 Protocole

Dans l'expérience, nous devons effectuer du "tracking" avec un microscope. Voici le protocole de l'expérience.

- 1.Diluer la solution d'algues préparée et placer la solution dans le tube conique Falcon™.
- 2.Coller la piscine sur la lame de verre.
- 3.Ajouter une petite goutte de solution d'algues diluée à la piscine à l'aide d'un pipet-man.
4. Coller une lamelle de l'autre côté de la piscine pour sceller.
- 5.Fixer la combinaison de lame, de piscine et de lamelle préparée sur le support du microscope électronique.
- 6.Allumer le microscope électronique, ouvrir le logiciel de tracking et régler les paramètres.

7. Utiliser un microscope Lagrangien pour identifier les coordonnées de la source lumineuse et du centre de la "piscine". Assurez-vous que la profondeur de la "piscine" atteint bien les 210 microns attendus et relevez la température dans la salle de microscope.

8. Ajuster manuellement le levier pour sélectionner une algue nageuse. Commencez par suivre ces algues durant une période sans source lumineuse additionnelle, en n'utilisant que la source lumineuse rouge. Puis, activez notre source lumineuse LED bleue et poursuivez le tracking des algues.

9. Arrêter le tracking si le nageur croise une autre algue ou si le logiciel ne parvient plus à suivre l'algue préalablement sélectionnée. Ensuite, éteindre la source de lumière LED bleue. Cela nous permet d'obtenir des données fiables.

10. Patienter 2 minutes afin de garantir que l'algue ne soit plus influencée par la source de lumière LED bleue et qu'elle revienne à un comportement de déplacement aléatoire. Réitérer les étapes 8 et 9 pour tracking une autre algue individuellement..

12. Sauvegarder les données expérimentales sur le disque dur, puis exploitez Matlab pour les traiter.

Il est important de souligner que, pendant l'expérience, la température ambiante ne doit pas excéder 30°C. D'après les observations d'un stagiaire précédent, l'algue cesse de nager si la température dépasse cette limite. De plus, chaque "piscine" préparée ne peut être utilisée que pendant un maximum de 4 heures. Après ce délai, l'environnement de la "piscine" n'est plus stérile et la quantité d'oxygène qu'elle contient devient insuffisante, rendant les algues inactives.

De plus, après l'expérience, il est essentiel de déposer la "piscine" contenant les algues ainsi que la lame de verre dans le bidon jaune afin d'éviter toute contamination biologique. La solution d'algues restant dans le tube doit d'abord être neutralisée avec de l'eau de javel. Ensuite, versez cette solution désinfectée dans le bidon jaune et jetez le tube à centrifuger dans la poubelle biologique.

5 Résultats

Pour représenter nos résultats expérimentaux, nous avons recouru à Matlab pour tracer la trajectoire de chaque algue individuelle sur la carte lumineuse. Les figures ci-dessous présentent une sélection des résultats que nous avons obtenus.(Figure 15 et Figure 16) Le programme python est en Annexe7.

Sur ces deux illustrations, le cercle bleu symbolise la "piscine" dans le plan (x, y). Les trajectoires empruntées par différentes algues individuelles sont représentées par des lignes de couleurs distinctes, les points rouges indiquent le point de départ de chaque trajectoire d'algue avant l'introduction de la lumière bleue, tandis que les points bleus marquent la position de l'algue au moment de l'ajout de la source de lumière bleue. Ces images montrent que, en l'absence de lumière bleue, les algues se déplacent de manière aléatoire. Lorsque la lumière bleue est introduite, toutes tendent à se diriger vers la zone la moins éclairée de la carte, c'est-à-dire vers la direction de moindre intensité

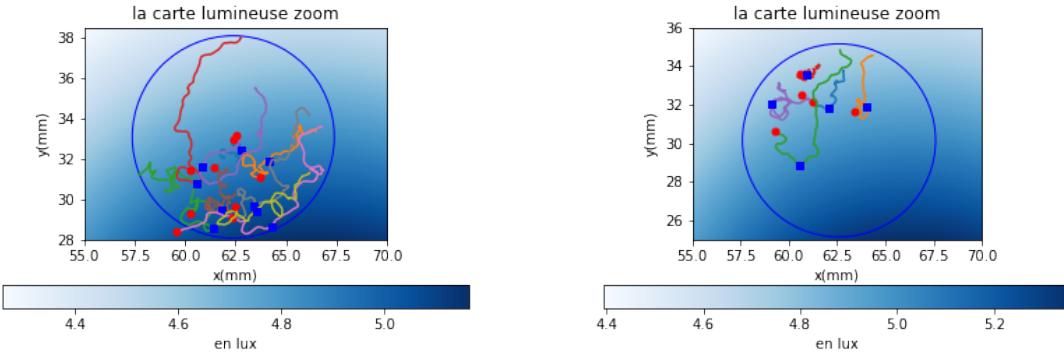


Figure 15: Résultats du 22 juin

Figure 16: Résultats du 4 juillet

lumineuse. Ces observations suggèrent que les algues manifestent une phototaxie négative dans nos conditions expérimentales. Cependant, cette tendance n'est pas absolue. Lors de certaines mesures, nous avons observé une algue qui, contrairement aux autres, se dirige vers des zones de forte intensité lumineuse, traduisant ainsi une phototaxie positive. Nous postulons que ce comportement pourrait résulter d'une particularité ou anomalie biologique.

Pour une observation optimale des trajectoires des algues en l'absence et en présence de sources lumineuses, nous représentons ci-dessous les deux scénarios de manière distincte. Et nous rassemblons les points de départ des différentes algues en les positionnant tous au point de coordonnées (0, 0). Voici le graphique illustrant ces trajectoires.(Figure 17 et Figure 18)Le programme Matlab est en Annexe8.

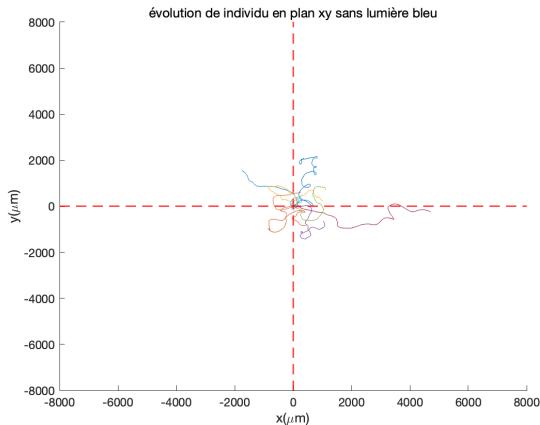


Figure 17: Evolution dans le plan xy sans lumière bleu

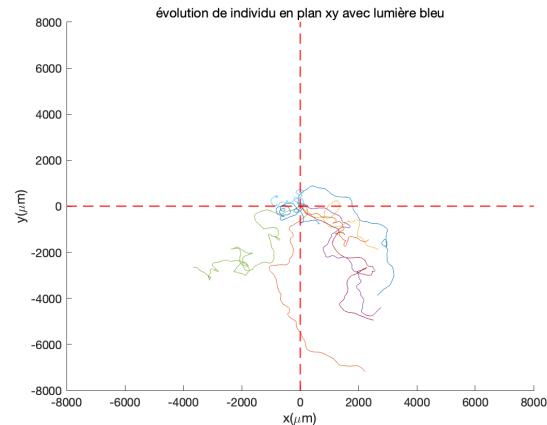


Figure 18: Evolution dans le plan xy avec lumière bleu

Sur la base de ces deux graphiques, il est manifeste que, sans source lumineuse bleue, les algues se déplacent de manière aléatoire, leurs trajectoires étant réparties dans les quatre quadrants. Cependant, avec l'introduction d'une source lumineuse bleue orientée positivement sur l'axe y, toutes les algues s'orientent vers l'axe y négatif. Ainsi, leurs trajectoires se retrouvent principalement dans les troisième et quatrième quadrants. Ces

observations renforcent notre observation initiale : les algues cultivées dans nos conditions expérimentales manifestent une phototaxie négative.

Comme indiqué précédemment, l'intensité lumineuse de notre LED bleue présente une variation linéaire selon l'axe y et gaussienne selon l'axe x. Pour déterminer si la réaction des algues est également distincte sur l'axe x, nous avons représenté les positions des algues sur l'axes x en fonction du temps.(Figure 19 et Figure 20)Le programme Matlab est en Annexe9.

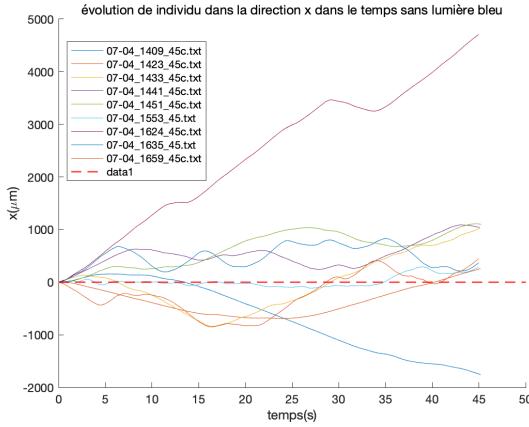


Figure 19: Evolution sur x sans lumière bleu

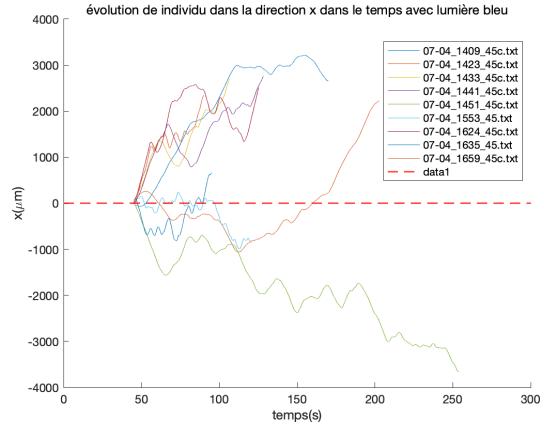


Figure 20: Evolution sur x avec lumière bleu

En comparant les figures avec et sans la présence de la lumière bleue, il apparaît clairement que les algues ne montrent pas de préférence directionnelle marquée sur l'axe x. Cette observation pourrait s'expliquer par la faible variation d'intensité lumineuse dans cette direction.

Après avoir confirmé que l'algue présente une phototaxie négative dans la direction y, nous avons également fait des recherches exploratoires. Sur la base de la position et du temps de la trajectoire de l'algue obtenus lors de l'expérimentation, nous sommes en mesure de déterminer son déplacement dans les directions x et y sur une période donnée, ce qui nous permet de calculer sa vitesse. Par ailleurs, en utilisant la formule

$$\tan(\theta) = \frac{dy}{dx} \quad (6)$$

nous pouvons déterminer l'angle de nage de l'algue par rapport à l'axe de x. De plus, avec

$$v = \sqrt{v_x^2 + v_y^2} \quad (7)$$

nous obtenons la vitesse totale. À partir de ces données, nous sommes en mesure de construire un histogramme représentant la vitesse globale de chaque algue ainsi que l'angle de nage de chacune par rapport à l'axe de x. La Figure 21 et la Figure 22 illustrent les deux histogrammes que nous avons mentionnés, tous deux concernant la même algue individuelle. Les programmes Matlab sont en Annexe10 et Annexe11. Les histogrammes des autres individus d'algues se trouvent à l'annexe 12.

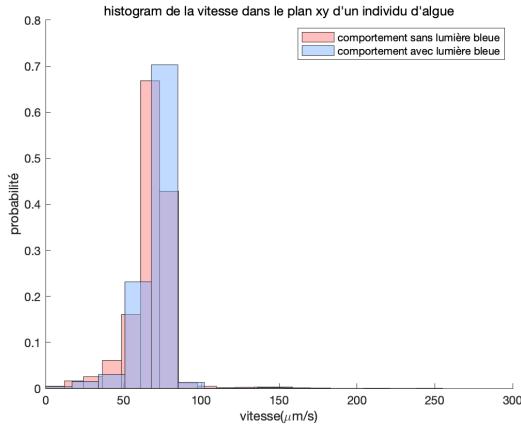


Figure 21: Répartition de la vitesse totale d'un individu d'algue

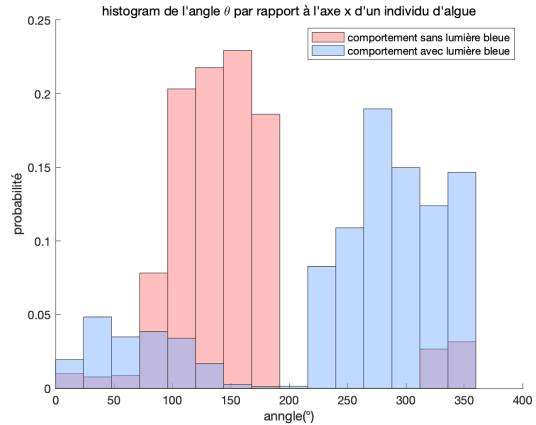


Figure 22: Répartition de l'angle par rapport à l'axe x d'un individu d'algue

D'après l'histogramme de la vitesse, nous observons que la vitesse totale des algues reste constante, avant et après l'introduction de la source lumineuse bleue. Cela démontre que la source lumineuse bleue influence uniquement la direction de déplacement des algues et non le module de leur vitesse de mouvement. D'après l'histogramme de l'angle, il est manifeste qu'après introduction de la source lumineuse bleue, la majorité des angles de nage des algues se concentrent autour de 270 degrés, indiquant un mouvement dans la direction négative de l'axe y. Cependant, nous observons également une faible distribution autour de 90 degrés, correspondant à des algues se déplaçant dans la direction positive de l'axe y. Ces observations suggèrent que certaines algues pourraient d'abord s'orienter vers la source lumineuse bleue avant de s'en éloigner.

6 Conclusion

Au cours de ces huit semaines de stage, j'ai eu le privilège de rejoindre le projet du laboratoire PMMH. Cette expérience m'a permis de me familiariser pleinement avec l'environnement professionnel, l'ambiance de travail et la nature même de la recherche. Entouré de seniors éminents en biophysique, j'ai pu échanger avec des experts, envisager mon avenir professionnel, enrichir mon réseau et perfectionner mes compétences techniques.

Premièrement, ce stage m'a offert des expériences de recherche précieuses. J'ai approfondi mes connaissances sur diverses techniques expérimentales biologiques, allant de la culture des algues à leur inactivation, en passant par l'usage d'équipements spécialisés et la stérilisation. J'ai également été formé aux normes de sécurité en laboratoire, me préparant à faire face à diverses situations d'urgence. De plus, j'ai enrichi mes compétences en programmation avec Python et Matlab et me suis familiarisé avec le microscope Lagrangien. Je suis très enchanté de faire des contributions au étude du phototaxie négative des microalgues phototaxis motiles dans notre groupe.

Dans le cadre de mes recherches, une question qui m'a particulièrement interpellé était

l'évolution de l'angle de nage des algues après <https://www.overleaf.com/project/64c8a38d166344d60617> de la source de lumière bleue. Même si je n'ai pas pu obtenir des résultats concrets durant mon stage à ce sujet, la complexité de cette interrogation a renforcé ma curiosité et m'a montré l'importance d'explorer tous les aspects d'un phénomène biologique. Ces défis m'ont rappelé la nécessité de la persévérance en recherche scientifique et la valeur d'une approche rigoureuse.

Par ailleurs, au fil du stage, les échanges réguliers avec mes collègues et ma participation aux activités d'équipe ont été bénéfiques. La bienveillance et la patience de chacun envers les stagiaires m'ont aidé à m'intégrer rapidement. Cette expérience m'a également permis de renforcer mon travail d'équipe, nécessitant souvent le partage de ressources et d'espaces avec d'autres groupes, et même de cultures d'algues au sein de notre propre équipe. Grâce à ces interactions, j'ai appris à mieux gérer mon temps, à collaborer efficacement et à surmonter les tensions éventuelles.

Pour conclure, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ceux qui m'ont soutenu pendant ce stage, notamment Mme Florence Elias, Mme Jeanne Moscatelli et M. Eric Clément. Ils ont été non seulement une source d'inspiration mais ont également pris le temps de me guider et de fournir des suggestions précieuses pour ma recherche. Ce stage restera pour moi une expérience académique mémorable et inspirante. En regardant vers l'avenir, je suis convaincu de l'importance de rester à la pointe des technologies tout en consolidant mes bases académiques. Je suis déterminé à poursuivre ma quête d'excellence en tant que chercheur.

References

- [1] T. Darnige; N. Figueroa-Morales; P. Bohec; A. Lindner; E. Clément. Lagrangian 3d tracking of fluorescent microscopic objects in motion. *Rev Sci Instrum* 88, 055106 (2017), May 2017.
- [2] Eric Lauga; Raymond E. Goldstein. Dance of the microswimmers. *Physics Today* 65 (9), 30–35 (2012), September 2012.
- [3] Salima Rafai; Philippe Peyla. La lumière au bout du tunnel, ou comment concentrer et séparer des microalgues en combinant lumière et écoulement. *Reflets de la physique*, April 2018.
- [4] Patti Kay; Rajdeep Choudhury; Marietha Nel; Monica V. Orellana; Pierre M. Durand. Multicolour flow cytometry analyses and autofluorescence in chlorophytes: lessons from programmed cell death studies in chlamydomonas reinhardtii. *Journal of Applied Phycology volume 25, pages 1473–1482 (2013)*, 20 January 2013.
- [5] <https://www.oceaninsight.com/globalassets/catalog-blocks-and-images/manuals--instruction-ocean-optics/spectrometer/usb4000operatinginstructions.pdf>. Usb4000 fiber optic spectrometer installation and operation manual.

[6] <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=119543&demande=desc>. Hotte à flux laminaire vertical ou enceinte de sécurité biologique (esb) de classe ii.

7 Annexe

```

file_path = "data/40.csv"
data = np.loadtxt(file_path, delimiter=',', skiprows=1)
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
plt.plot(data[:,0],data[:,1],label='original')
mean = 65.75
std = 35.93
x_min = np.min( data[:,0])
x_max = np.max( data[:,0])
xx = np.linspace( x_min, x_max, 100)
a=12706.04
yy = a / ( std * np.sqrt(2 * np.pi)) * np.exp( - (xx - mean)**2 / ( 2 * std**2) )
plt.plot(xx,yy,label='fit')
import scipy as sc
from scipy.optimize import curve_fit
x=data[:,0]
y=data[:,1]
def func(x, a, c, d):
    return a / (d * np.sqrt(2 * np.pi)) * np.exp( - (x - c)**2 / ( 2 * d**2) )
popt,pcov=curve_fit(func,x,y)
a_fit, c_fit,d_fit = popt
print(a_fit, c_fit,d_fit)
plt.xlabel('distance(mm)')
plt.ylabel('niveau de gris')
plt.title("le graphique de l'intensité en niveaux de gris avec la distance 40mm")
plt.legend()
plt.savefig('niveaugris')

```

Annexe1: Programme Python pour générer un graphique de l'intensité en niveaux de gris

```

import numpy as np
sigma=np.array([7.51074873931452, 18.25667137948782, 16.431768228447115, 21.07800545569662, 25.151302308088667,
26.39396019575723, 20.65107333809265, 33.3884297512371, 25.93443290319632, 38.31891333174664, 40.18785837984453])
a=np.array([12219.630341895903,12522.6388987689256,12774.737541128969,12706.84528822,12597.863986885083,12436.214661158247])
y=np.array([0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50])
Ig = sigma + np.sqrt(2 * np.pi)
coff1 = np.polyfit(y[1:11], Ig[1:11], 1)
slope1 = coff1[0]
intercept1 = coff1[1]
x_line1 = np.linspace(min(y[1:11]), max(y[1:11]), 100)
y_line1 = slope1*x_line1 + intercept1
coff2 = np.polyfit(y[4:10], Ig[4:10], 1)
slope2 = coff2[0]
intercept2 = coff2[1]
x_line2 = np.linspace(min(y[4:11]), max(y[4:11]), 100)
y_line2 = slope2*x_line2 + intercept2
print(slope1,slope2)
print(intercept1,intercept2)
import matplotlib.pyplot as plt
plt.figure()
plt.plot(x_line1, y_line1, label='Fitted Line première ')
plt.plot(x_line2, y_line2, label='Fitted Line deuxième ')
plt.scatter(y,Ig, label='data original')
plt.xlabel('la distance entre la lunière et de la feuille blanche(mm)')
plt.ylabel('la valeur de Ig')
plt.title('Ig en fonction de la distance')
plt.legend()
plt.savefig('Ig')

```

Annexe2: Programme Python pour générer un graphique de I1 en fonction de la distance

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
sigma=np.array([7.51074873931452, 18.25667137948782, 16.431768228447115, 21.07800545569662, 25.151302308088667
26.39396019575723, 20.65107333809265, 33.3884297512371, 25.93443290319632, 38.31891333174664, 40.18785837984453])
y = np.array([0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50])
coff1 = np.polyfit(y[0:5], sigma[0:5], 1)
slope1 = coff1[0]
intercept1 = coff1[1]
x_line1 = np.linspace(min(y[0:5]), max(y[0:5]), 100)
y_line1 = slope1*x_line1 + intercept1
coff2 = np.polyfit(y[4:10], sigma[4:10], 1)
slope2 = coff2[0]
intercept2 = coff2[1]
x_line2 = np.linspace(min(y[4:11]), max(y[4:11]), 100)
y_line2 = slope2*x_line2 + intercept2
print(slope1,slope2)
print(intercept1,intercept2)
plt.figure()
plt.plot(x_line1, y_line1, label='Fitted Line première ')
plt.plot(x_line2, y_line2, label='Fitted Line deuxième ')
plt.scatter(y, sigma, label='data original')
plt.xlabel('la distance entre la lunière et de la feuille blanche (mm)')
plt.ylabel('écart-type $\sigma$signas (mm)')
plt.title('écart-type $\sigma$signas en fonction de la distance')
plt.legend()
plt.savefig('ecart.png')

```

Annexe3: Programme Python pour générer un graphique de écart-type σ en fonction de la distance

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

mu = np.array([66.29185474368438, 66.92275489488971, 66.8422986708452, 67.33788313812745, 66.944480886973
               , 66.9791263388267, 66.91416978622682, 65.81026219057647, 65.75358190835938, 65.61756430527, 65.21966828995663])
y = np.array([8, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50])
print(sum(mu) / len(mu))
plt.figure()
plt.plot(y, mu,label='data fit')
x=np.arange(8,66.29185474368438)
plt.plot(x, label='moyenne')
plt.scatter(y, mu)
plt.xlabel('la distance entre la lumière et de la feuille blanche (mm)')
plt.ylabel('la moyenne (mm)')
plt.ylim(68, 70)
plt.title('moyenne en fonction de la distance')
plt.legend()
plt.savefig('mu.png')

```

Annexe4: Programme Python pour générer un graphique de moyenne en fonction de la distance

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.patches import Circle

def heat_map_function(x, y):
    return 3.74/120.67493776936143*(-2.0881936966657793*y+225.0846226026504)*
    np.exp( -(x - 66.29185474368438)**2 / (2 * (0.521040738013639*y+15.040377990789308)**2) )

x = np.linspace(55, 70, 100)
y = np.linspace(25, 36, 100)
X, Y = np.meshgrid(x, y)

Z = heat_map_function(X, Y)
# plt.figure(figsize=(20, 20))
plt.imshow(Z, cmap='Blues', extent=[x.min(), x.max(), y.min(), y.max()], origin='lower')
plt.colorbar(label='en lux', orientation='horizontal')

plt.xlabel('x(mm)')
plt.ylabel('y(mm)')
plt.title('la carte lumineuse zoom')

center = (66.29185474368438-3.6905, 30.142)
#center = (66.29185474368438-3.903, 33.079)
radius = 5

circle = Circle(center, radius, edgecolor='blue', facecolor='none',label='piscine')

ax = plt.gca()
ax.add_patch(circle)

ax.set_xlim(x.min(), x.max())
ax.set_ylim(y.min(), y.max())

```

Annexe5: Programme Python pour générer la carte lumineuse

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.patches import Circle

def heat_map_function(x, y):
    return 3.74/120.67493776936143*(-2.0881936966657793*y-
    +225.0846226026504)*np.exp( -(x - 66.29185474368438)**2 / (2 * (0.521040738013639*y+15.040377990789308)**2) )

x = np.linspace(0, 120, 100)
y = np.linspace(0, 50, 100)
X, Y = np.meshgrid(x, y)

Z = heat_map_function(X, Y)
# plt.figure(figsize=(20, 20))
plt.imshow(Z, cmap='Blues', extent=[x.min(), x.max(), y.min(), y.max()], origin='lower')
plt.colorbar(label='en lux', orientation='horizontal')
plt.scatter(66.29185474368438, 0, color='lightblue', marker='s',label='LED bleue')

plt.xlabel('x(mm)')
plt.ylabel('y(mm)')
plt.title('la carte lumineuse')

center = (66.29185474368438-3.983, 33.079)
radius = 5

circle = Circle(center, radius, edgecolor='blue', facecolor='none',label='piscine')

ax = plt.gca()
ax.add_patch(circle)

ax.set_xlim(x.min(), x.max())
ax.set_ylim(y.min(), y.max())

plt.legend()
# plt.grid(True)
plt.savefig('carte')

```

Annexe6: Programme Python pour générer la carte lumineuse zoom

```

import numpy as np
from matplotlib import pyplot as plt
from matplotlib.patches import Circle
def f(x,y):
    return 3.74/(126.67493779536143)*(-2.-0.8881936966557793*y+225.884622620584)*np.exp(-(x - 66.29185474368438)**2 / (2 * (8.521
x = np.linspace(52, 70, 100)
y = np.linspace(25, 36, 100)
X, Y = np.meshgrid(x, y)
Y = np.sin(X)
circle = Circle((66, 33), 5, color='blue')
plt.figure(figsize=(20, 20))
plt.imshow(circle, cmap='Blues', extent=[x.min(), x.max(), y.min(), y.max()], origin='lower')
plt.colorbar(label='en lux', orientation='horizontal')
plt.xlabel('Longitude')
plt.ylabel('Latitude')
plt.title('la carte lumineuse zoom')
center = (66, 29185474368438-3.6985, 38.142)
radius = 5
circle = Circle(center, radius, edgecolor='blue', facecolor='none', label='piscine')
ax = plt.gca()
ax.add_patch(circle)
ax.set_xlim(x.min(), x.max())
ax.set_ylim(y.min(), y.max())
fileName = 'data/06-22_1532_60c.txt', 'data/06-22_1533_60c.txt', 'data/06-22_1545_60c.txt', 'data/06-22_1553_60c.txt', 'data/06-22_1554_60c.txt'
fileNames = ['data/07-04_1409_45c.txt', 'data/07-04_1423_45c.txt', 'data/07-04_1433_45c.txt', 'data/07-04_1441_45c.txt', 'data/07-04_1444_45c.txt']
for file in fileNames:
    data = np.loadtxt(file)
    t = data[:, 0]
    tini = T[0]
    X = data[:, 1]/1000
    Y = data[:, 2]/1000+36.6905
    t = (data[:, 1]-2)/(1000)+38.142
    tshp = 45
    n = t.shape[0]
    plt.plot(X[0], Y[0], 'ro', markersize=5)
    plt.plot(X[0], Y[0], 'bs', markersize=5)
    plt.savefig('cartezoom')
plt.savefig('cartezoom')

```

Annexe7: Programme Python pour générer la carte lumineuse zoom avec trajectoire

```
% visualisation du trajet en 2D(plusieurs fichiers)
figure;
hold on;
for i = 1:numel(fileNames)
    fileName = fileNames{i};
    date = importdata(fileName);
    T=date(:,1);
    tini=T(1);
    long=length(T);
    for j=1:long
        T(j)=(T(j)-tini)/40;
    end
    X=date(:,2);
    Y=date(:,3);
    Z=date(:,4);
    tsph=45;
    n=tspkh*40;
    X=X-X(1);
    Y=Y-Y(1);
    hold on;
    plot(X(1:n),Y(1:n));
end
hold off;
title('évolution de individu en plan xy sans lumière bleu');
ylim([-8000 8000]);
xlim([-8000 8000]);
xlabel('x(mum)');
ylabel('y(mum)');
yline(0, '--', 'Color', 'r', 'LineWidth', 1.5);
xline(0, '--', 'Color', 'r', 'LineWidth', 1.5);
print(gcf, '0704xysans', '-dpng');
```

Annexe8: Programme Matlab pour générer le trajet en 2D

```

%% visualisation évolution y(plusieurs fichiers)
figure;
hold on;
for i = 1:numel(fileNames)
    fileName = fileNames(i);
    data = importdata(fileName);
    T=data(:,1);
    tini=T(1);
    long=length(T);
    for j=1:long
        T(j)=(T(j)-tini)/40;
    end
    Y=data(:,3);
    tsph=45;
    n=tsph*40;
    Y=Y(1:1);
    plot(T(1:n),Y(1:n));
end
hold off;
legend(fileNames, 'Interpreter', 'none','Location', 'best');
title('évolution de individu dans la direction y dans le temps sans lumière bleu');
yline([-8000 8000]);
xlabel('temps(s)');
ylabel('y(mum)');
print(gcf, '0704_45sans.png', '-djpeg');

```

Annexe9: Programme Matlab pour générer l'évolution y

```

%% histogram de la vitesse dans le plan xy(plusieurs fichiers)
for i = 1:numel(fileNames)
    fileName = fileNames{i};
    data = importdata(fileName);
    T=data(:,1);
    tini=T(1);
    long=length(T);
    for j=1:long
        T(j)=(T(j)-tini)/40;
    end
    X=data(:,2); Y=data(:,3); f=1;
    dx=X-circshift(X,f);
    vx=dx/(0.025*f);vx=vx(f+1:end);
    dy=Y-circshift(Y,f);
    vy=dy/(0.025*f);vy=vy(f+1:end);
    v=sqrt(vx.^2+vy.^2);
    tsph=45;n=tsph*40;
    figure;
    hold on;
    [counts1, edges1] = histcounts(v(1:n), 15, 'Normalization', 'probability');
    [counts2, edges2] = histcounts(v(n:end), 15, 'Normalization', 'probability');
    area1 = sum(counts1 .* diff(edges1));
    area2 = sum(counts2 .* diff(edges2));
    counts1 = counts1 * (area2 / area1);
    bar1 = bar(edges1(1:end-1), counts1, 'histc', 'FaceAlpha', 0.5);
    bar1.FaceColor =[1, 0.5, 0.5]; bar1.FaceAlpha = 0.5;
    bar2 = bar(edges2(1:end-1), counts2, 'histc', 'FaceAlpha', 0.5);
    bar2.FaceColor =[0.5, 0.7, 1]; bar2.FaceAlpha = 0.5;
    hold off;
    legendName1 = 'comportement sans lumière bleue';
    legendName2 = 'comportement avec lumière bleue';
    legend([legendName1,legendName2]);
    title("histogram de la vitesse dans le plan xy d'un individu d'algue");
    xlabel('vitesse(\num/s)'); ylabel('probabilité');
    nom=[fileName 'v.png'];
    print(gcf, nom, '-dpng');
end

```

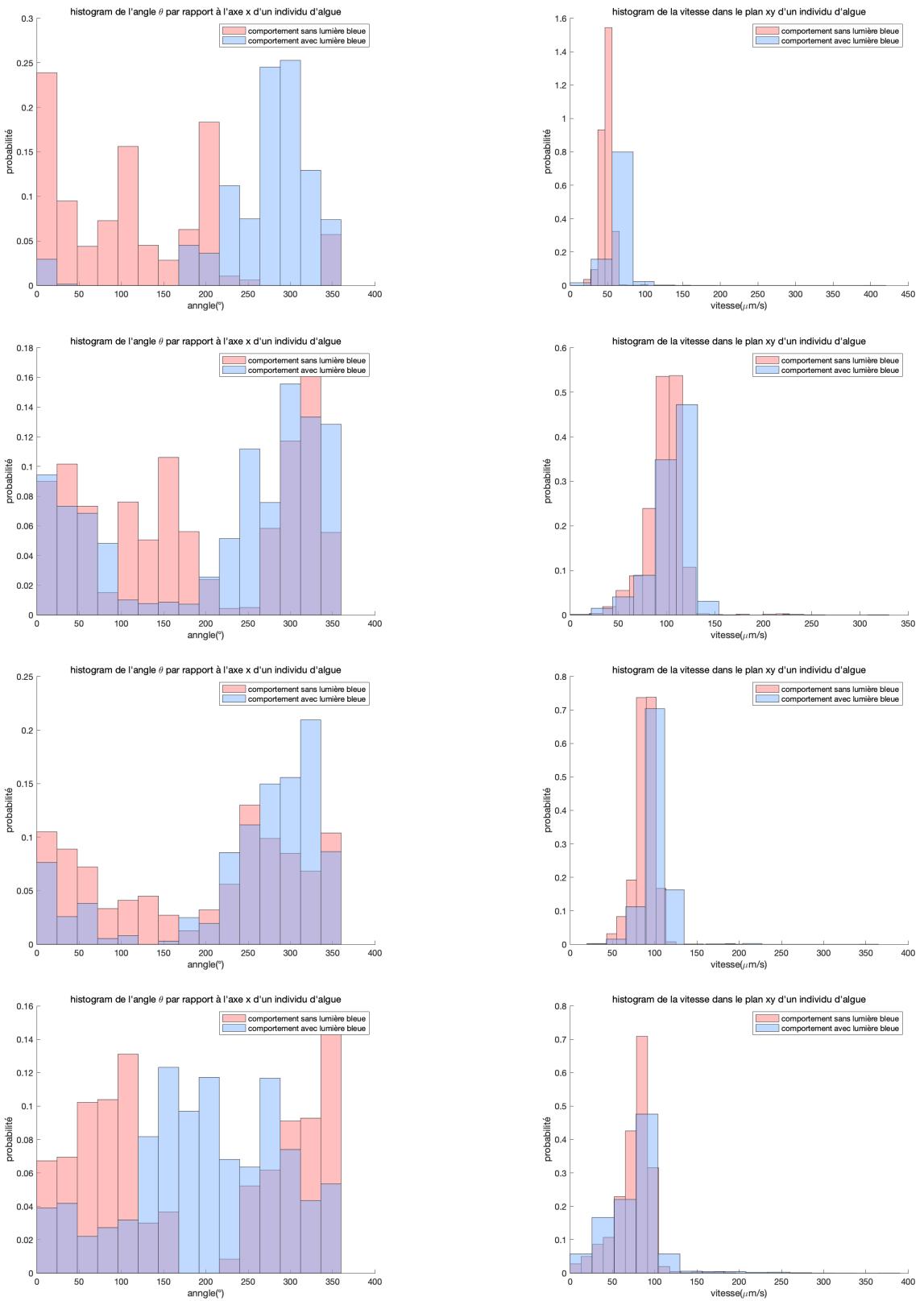
Annexe10: Programme Matlab pour générer l'histogram de la vitesse dans le plan xy d'un individu d'algue

```

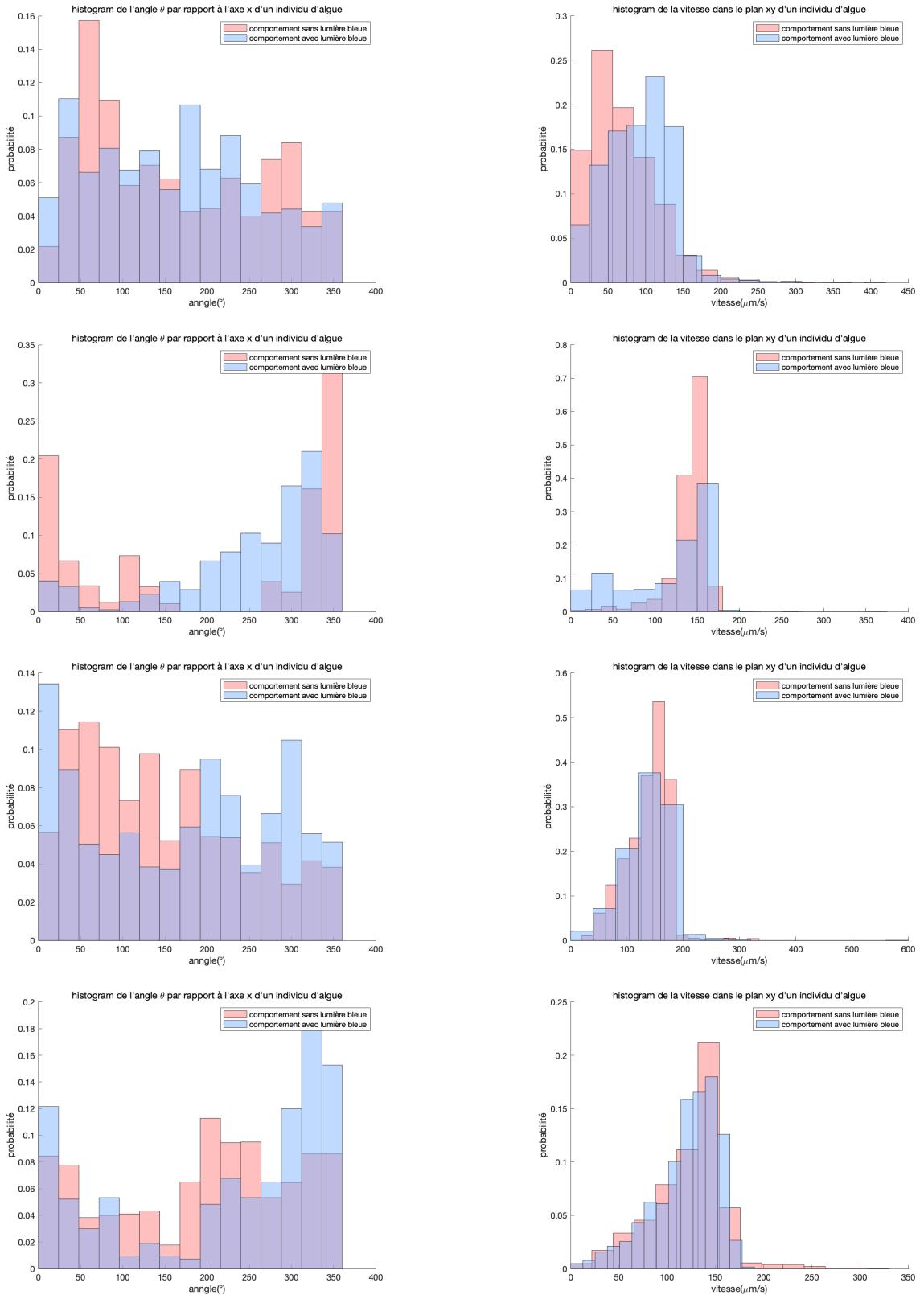
%% histogramme theta (plusieurs fichiers)
for i = 1:numel(fileNames)
    fileName = fileNames{i};
    data = importdata(fileName);
    T=data(:,1);
    tini=T(1);
    long=length(T);
    for j=1:long
        T(j)=(T(j)-tini)/40;
    end
    X=data(:,2);Y=data(:,3);f=40;
    dy=Y-circshift(Y,f);dx=X-circshift(X,f);
    theta=zeros(long-f,1);
    for k=1:long-1
        angle = atan2(dy(k), dx(k));
        angle = mod(angle, 2*pi);
        theta(k) = rad2deg(angle);
    end
    tsph=45;n=tsph*40;
    figure;hold on;
    [counts1, edges1] = histcounts(theta(1:n), 15, 'Normalization', 'probability');
    [counts2, edges2] = histcounts(theta(n:end), 15, 'Normalization', 'probability');
    area1 = sum(counts1 .* diff(edges1));
    area2 = sum(counts2 .* diff(edges2));
    counts1 = counts1 * (area2 / area1);
    bar1 = bar(edges1(1:end-1), counts1, 'histc');bar1.FaceColor =[1, 0.5, 0.5];
    bar1.FaceAlpha = 0.5;
    bar2 = bar(edges2(1:end-1), counts2, 'histc');bar2.FaceColor =[0.5, 0.7, 1];
    bar2.FaceAlpha = 0.5;
    hold off;
    legendName1 = ['comportement sans lumière bleue'];
    legendName2 = ['comportement avec lumière bleue'];
    legend([legendName1,legendName2]);
    title("histogram de l'angle \theta par rapport à l'axe x d'un individu d'algue");
    xlabel('angle(\degree)');
    ylabel('probabilité');
    nom=[fileName 'theta.png'];
    print(gcf, nom, '-dpng');
end

```

Annexe11: Programme Matlab pour générer l'histogram de θ d'un individu d'algue



Annexe12: D'autres histogrammes



Annexe12: D'autres histogrammes des individus d'algues