

LICENCE SCIENCE DE LA MATIÈRE  
École Normale Supérieure de Lyon  
Université Claude Bernard Lyon I

Stage 2024  
RATAJCZYK Romain  
L3 Physique

---

## Dynamique d'adsorption à l'interface liquide-vapeur de la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii*

---

**Résumé :** L'objectif principal de mon stage a été d'étudier l'interaction entre la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* et une interface liquide-vapeur, en particulier d'étudier l'adsorption à cette interface en ajoutant des produits dans le milieu. Au cours du stage, nous avons émis l'hypothèse que la photosynthèse jouait un rôle dans le processus d'adsorption, hypothèse qui a été largement solidifiée par nos expériences.

**Mots clefs :** Micro-algue, phototaxie, adsorption, interface, photosynthèse

Stage encadré par :

**Raphaël Jeanneret**

[raphael.jeanneret@phys.ens.fr](mailto:raphael.jeanneret@phys.ens.fr) / tél. 01 44 32 35 92

Laboratoire de Physique de l'école normale supérieure

24 Rue Lhomond, 75005 Paris

<https://www.lpens.ens-psl.eu/>



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 La micro-algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>1</b>
1.1 Une cellule biologique (presque) ordinaire . . . . .	1
1.2 La nage . . . . .	2
1.2.1 Deux flagelles . . . . .	2
1.2.2 Run and Tumble motion . . . . .	3
1.2.3 Instabilités hydrodynamiques . . . . .	5
1.3 La photosynthèse . . . . .	6
1.4 La phototaxie . . . . .	6
1.4.1 L'Eyespot . . . . .	7
<b>2 Entretien des micro-algues et dispositif expérimental</b>	<b>9</b>
2.1 Dilutions sous hotte à flux laminaire . . . . .	10
2.2 Préparation du puits en PDMS pour la suspension de <i>C.reinhardtii</i> . . . . .	11
2.3 Panneau LED et microscope à focus continu pour l'acquisition des images . . . . .	12
2.3.1 Problèmes rencontrés . . . . .	14
2.3.2 Solutions . . . . .	14
<b>3 Dynamique d'adsorption de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : traitement d'images et analyses statistiques</b>	<b>14</b>
3.1 Programme de localisation des agrégats d'adsorption . . . . .	14
3.2 Problèmes rencontrés . . . . .	16
3.2.1 Liquéfaction sur la paroi intérieure du couvercle en PDMS . . . . .	16
3.2.2 Mouvement global d'origine peu claire . . . . .	17
3.3 Protocoles de préacquisitions . . . . .	18
3.4 Lien entre photosynthèse et adsorption fortement suspecté . . . . .	19
3.4.1 Réduction de l'adsorption par inhibition de la photosynthèse . . . . .	19
3.4.2 <i>C.reinhardtii</i> en milieu minimal au profit de la photosynthèse . . . . .	21
3.5 Tests d'altération de l'environnement de <i>C.reinhardtii</i> . . . . .	22
3.5.1 Ajout de glucose . . . . .	22
3.5.2 Ajout de PVA . . . . .	22
3.5.3 Un surfactant, le C12TAB . . . . .	22
3.5.4 Ajout de silice . . . . .	23
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>23</b>
<b>Annexe A</b>	<b>23</b>
<b>Annexe B</b>	<b>26</b>
<b>Annexe C</b>	<b>26</b>
<b>Références</b>	<b>29</b>

## Remerciements

Je remercie toute l'équipe Physique Multi-échelles du vivant du LPENS pour cette première immersion dans le monde de la recherche, qui fut très agréable et très instructive. Je tiens à remercier Isabelle Eisenmann, pour sa thèse très instructive sur *Chlamydomonas reinhardtii* et pour son aide. Je remercie également Giovanni Iacucci pour son aide dans la culture des algues, ainsi que Clara Fronda pour avoir répondu à mes questions. Merci à Cécile Monteux, chercheuse à l'ESPCI, de nous avoir prêté des produits pour nos expériences. Merci à Aurélie Pierret de nous avoir formé à la salle blanche, un autre stagiaire et moi. Merci Cendrine Moskalenko de m'avoir conseillé cette équipe de recherche, je ne regrette pas du tout d'avoir choisi ce stage ! Il m'a surpris par son originalité, par les possibilités à explorer, et par tous les aspects physiques qu'il touche. Enfin merci particulièrement à Raphaël Jeanneret, pour m'avoir longuement accompagné et pour ses explications détaillées des manips et des principes mis en jeu, tout en me laissant une certaine liberté dans mes choix d'exploration.

## Introduction

Il y a quelques années, en observant la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* à la lumière, mon encadrant Raphaël Jeanneret a remarqué qu'elles avaient tendance à s'adsorber à l'interface avec l'air. Depuis, l'équipe a réussi à démontrer que les micro-algues se fixent à l'interface à l'aide de leurs flagelles, bien qu'aucune preuve de leur intention de le faire n'ait encore été établie. Ce stage s'intéresse à des pistes d'exploration sur ce phénomène d'adsorption, l'une d'elle étant que l'adsorption serait influencée par une ou plusieurs molécule(s) sécrétée(s) par les algues.

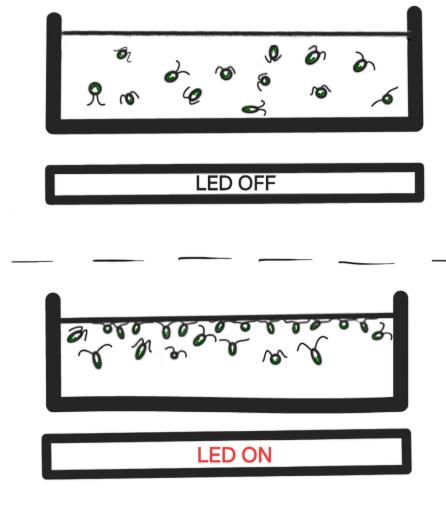


FIGURE 1 – Adsorption observée après illumination par le bas

La micro-algue, ses caractéristiques physiologiques et certains de ses phénomènes collectifs seront présentés dans un premier temps. Ensuite, il s'agit de présenter le dispositif expérimental et la procédure rigoureuse d'entretien des micro-algues. L'analyse des images, certaines hypothèses et des explorations du fameux phénomène d'adsorption occuperont la troisième partie.

## 1 La micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii*

### 1.1 Une cellule biologique (presque) ordinaire

*Chlamydomonas reinhardtii* est une espèce de microalgue verte unicellulaire appartenant à la classe des *Chlamydomonadales*, largement distribuée dans divers environnements terrestres et aquatiques. Les microalgues sont des organismes vivants qui jouent un rôle clé dans l'environnement et peuvent être utilisées pour la séquestration du CO<sub>2</sub>, ou la captation de métaux lourds pour la désintoxication d'eaux usées. *C.reinhardtii* a été découverte pour la première fois en Allemagne dans les années 1830, et elle est maintenant un organisme modèle prisé en recherche biologique en raison de sa facilité de manipulation et de culture en conditions contrôlées, sa capacité de croissance rapide, et son aptitude à la transformation génétique. Comme toutes les cellules, *C.reinhardtii* pratique la division cellulaire, et peut se diviser plusieurs fois lors de la mitose, chaque jour. Nos cellules se divisent environ par 3, mais elles peuvent se diviser davantage dans des conditions particulières [1]. Les caractéristiques uniques de *C.reinhardtii* en font un modèle puissant pour étudier divers processus biologiques comme la photosynthèse, le cycle cellulaire, et la biologie ciliale (étude des flagelles).

Dans ce stage, j'ai utilisé une souche sauvage de *C.reinhardtii* provenant d'une collection américaine, dont le nom est **CC125**.

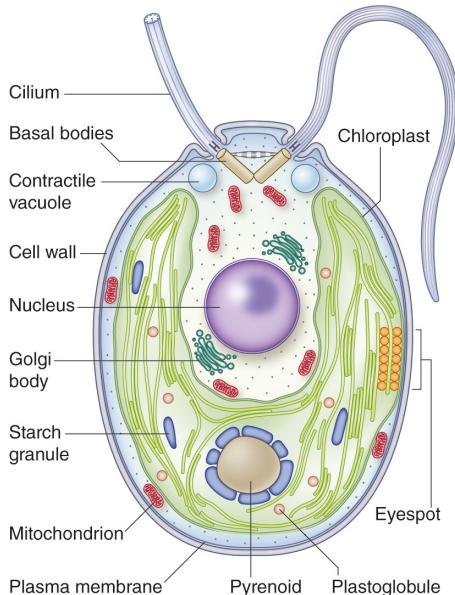


FIGURE 2 – *Chlamydomonas reinhardtii*. Tiré de [2]

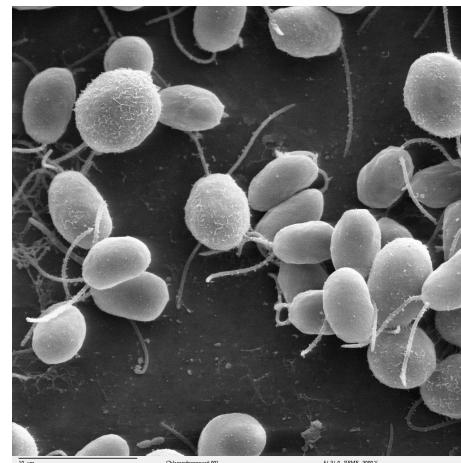


FIGURE 3 – *C.reinhardtii* (taille 5 à 10 µm) au microscope électronique à balayage, [3].

## 1.2 La nage

### 1.2.1 Deux flagelles

*C.reinhardtii* est dotée à l'avant de deux flagelles disposés symétriquement, qui lui permettent avant tout de pouvoir nager. Ces flagelles, longs de 10 µm et épais de 100nm sont des assemblages complexes de doublets de microtubules et de protéines, dont la dynéine, moteur moléculaire. La dynéine joue un rôle crucial dans le mouvement des flagelles, en convertissant l'énergie chimique de l'ATP (adénosine tri-phosphate) en travail mécanique. Lorsque l'ATP se lie à la dynéine et est hydrolysée, la dynéine subit des changements conformationnels qui génèrent une force. Cette force entraîne le glissement des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres, ce qui entraîne le battement des flagelles, et la nage [4]. *C.reinhardtii* utilise également ses flagelles comme véritables récepteurs sensoriels pour percevoir son environnement et répondre en conséquence, détectant des éléments tels que la composition chimique, les gradients chimiques (chimiotaxie) et ils permettent à la cellule de nager en réponse à la lumière (phototaxie). A noter que les flagelles sont également impliqués dans le processus de division cellulaire, *C.reinhardtii* ne nage donc pas pendant la mitose ! [5]

### La nage en brasse à faible nombre de Reynolds

Dans un tel environnement biologique microscopique, nager relève d'une certaine technique... En effet, à très faible nombre de Reynolds, les effets de viscosité dominent et *C.reinhardtii* doit lutter contre les forces visqueuses, comme c'est le cas pour la plupart des petits organismes biologiques. Pourtant, *C.reinhardtii* bat des records ! Un protocole de tracking détaillé dans la sous partie suivante a permis d'en flasher certaines à presque 200 µm/s, pour une vitesse moyenne de 110µm/s. C'est plus que 10 fois leur taille par seconde : à titre de comparaison, c'est comme si nous pouvions nager à plus de 65km/h, une vitesse que seuls les plus rapides des requins peuvent atteindre...

Nous pouvons estimer le nombre de Reynolds caractéristique de l'écoulement autour des cellules :

$$Re = \frac{\rho U L}{\eta}$$

En prenant les valeurs suivantes :

$$\begin{aligned}\rho &= 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \\ U &= 100 \text{ } \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \\ L &= 10 \text{ } \mu\text{m} \\ \eta &= 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}\end{aligned}$$

Nous obtenons :

$$Re = 10^{-3}$$

(données pour l'eau, mais les milieux dans lesquels baignent en général les micro-algues ont des densités et viscosités similaires à l'eau)

Le terme convectif et non linéaire de l'équation de Navier Stokes est négligeable et celle-ci devient alors linéaire :

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v} \right) = -\vec{\nabla}P + \eta \vec{\Delta} \vec{v} + \rho \vec{g}$$

Un battement réciproque des flagelles se compenserait exactement et ne permettrait alors pas à *C.reinhardtii* d'avancer, elle resterait sur place. L'évolution a alors choisi pour *C.reinhardtii* un mouvement de brasse asymétrique à la fréquence de 50 Hz, en voici un slowmotion :



FIGURE 4 – Mouvement de brasse asymétrique des flagelles de *C.reinhardtii*. Trouvé sur [6]

### 1.2.2 Run and Tumble motion

Nous avons vu précédemment que la dynéine faisait un travail remarquable au sein des flagelles. En plus de contribuer à leur mise en mouvement, elle contribue à garder une solide synchronisation entre les battements des deux flagelles, ce qui permet à *C.reinhardtii* de nager droit devant. Cependant, dans le noir, il a été observé une interruption stochastique de cette synchronisation : une des deux flagelles se met à battre plus vite que l'autre de manière transitoire, ce qui peut mener à des réorientations plus ou moins importantes, ce qui donne lieu à une marche aléatoire que l'on qualifie de "Run and Tumble", où l'algue nage de manière ballistique pendant quelques secondes puis se réoriente et reprend un mouvement linéaire dans une autre direction [1] [6] [7]. Cet évènement peut également apparaître à la lumière, mais il est biaisé par la phototaxie, phénomène que l'on va étudier par la suite. Ces désynchronisations soudaines et aléatoires suivent une distribution de Poisson de temps caractéristique de 1 à 10 secondes, variant en fonction de plusieurs facteurs tels que la température, la lumière, le milieu chimique, l'hydrodynamique et l'âge de la culture cellulaire [8].

Cette loi Poissonienne a pu être observée expérimentalement à l'aide d'une méthode de suivi sur 1 minute des trajectoires des micro-algues individuelles en suspension diluée par 6 : (50  $\mu\text{L}$  d'algues et 250  $\mu\text{L}$  de TAP, le milieu utilisé, dans un puits en PDMS de 1cm de diamètre, voir la suite) et ce, malgré le biais de la phototaxie.

Un suivi plus long aurait provoqué des croisements de trajectoire et compliqué la méthode.

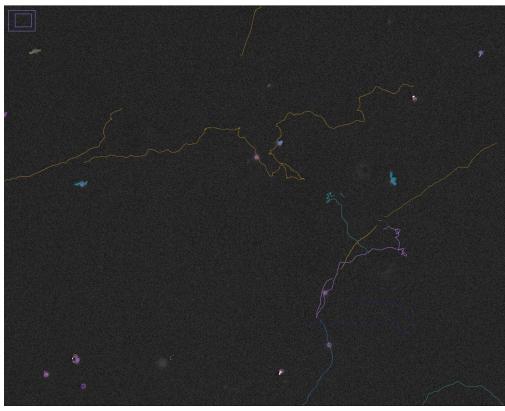


FIGURE 5 – Tracking en suspension diluée



FIGURE 6 – Marquage de suivi

La méthode utilise les données de tracking des particules de ImageJ, puis les analyse sur Python : l'idée est de vectoriser les trajectoires, et de déterminer les instants de changement de direction si deux vecteurs consécutifs diffèrent de plus d'un certain angle seuil. Certaines micro-algues ayant perdu leurs flagelles et présentes à l'image ont été filtrées à l'aide d'un critère de déplacement total minimal.

Bien que cette observation ne puisse pas être considérée comme une preuve en raison du biais introduit par la phototaxie et de l'imperfection du tracking, on retrouve néanmoins un temps caractéristique de désynchronisation des flagelles  $\tau_c^{exp} = 10s$  avec un écart type de 8s, élevé, typique d'une loi de Poisson. Ce temps  $\tau$  vaut 6s à un angle seuil de 10 degrés, et 13s à un angle seuil de 80 degrés. On écrit ainsi  $\tau_c^{exp} = 10 \pm 3s$  pour tenir compte de l'appréciation du changement de direction par le code Python.

La même méthode de tracking, mais avec un script Python qui ne retient que les lignes droites (à un angle seuil près) et qui retourne la vitesse de chaque trajectoire en fonction de la distance parcourue (avec conversion pixel/micromètre), retourne une vitesse moyenne de  $110 \mu\text{m}/\text{s}$  pour nos cellules. A un angle seuil de 10 degrés, la moyenne s'effectue sur la donnée de 200 vitesses. Selon des valeurs raisonnables d'angles seuils pour qualifier une trajectoire comme étant droite (inférieures à 40 degrés), le code retourne des vitesses moyennes dans l'intervalle  $[107 \mu\text{m}/\text{s}; 111 \mu\text{m}/\text{s}]$

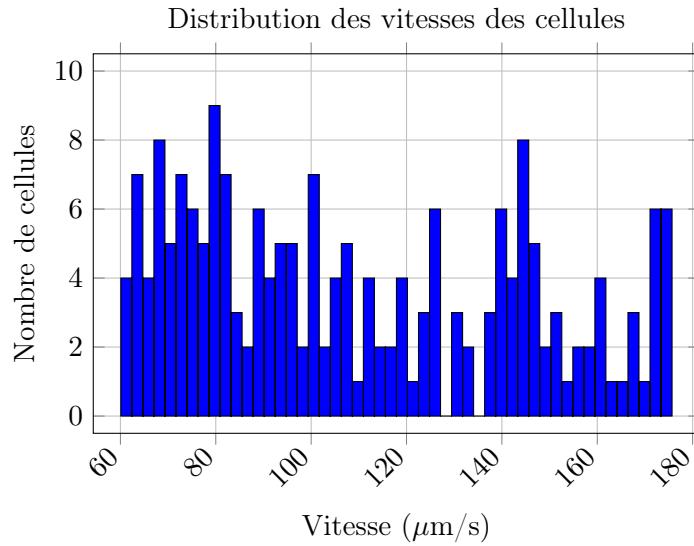


FIGURE 7 – Histogramme des vitesses des cellules

Cette méthode, encore rustique, a le mérite de donner un résultat encore satisfaisant comparé à l'ordre de grandeur couramment retenu dans la littérature ( $100 \mu\text{m}/\text{s}$ ) [1] [6]

### 1.2.3 Instabilités hydrodynamiques

Chez *C.reinhardtii* comme chez d'autres algues ou organismes biologiques, on peut observer un phénomène collectif particulier, la bioconvection [9] [10]. Celle-ci se comprend très bien si on se rappelle que dans une situation stable de deux liquides, le liquide le plus dense se situe en dessous. Dans le cas de *C.reinhardtii*, il peut se produire une accumulation de cellules à la surface principalement en raison d'un couple gravitationnel (gravitaxie) : le chloroplaste déplace le centre de gravité vers le fond de la cellule, ce centre de gravité ne coïncide plus avec le centre symétrique où s'applique la poussée d'Archimède (pour illustrer, on peut dire que la cellule est "bottom-heavy"). Cela introduit un biais directionnel qui fait nager l'algue vers le haut. Les cellules étant plus denses que le milieu dans lequel elles baignent, une accumulation à la surface est une situation instable, on est dans le cas d'une instabilité de type Rayleigh-Taylor : les algues se mettent alors à redescendre en colonnes que l'on peut appeler polypes de Taylor. Pour apparaître, la bioconvection demande notamment une concentration minimale et une hauteur minimale en algues. Dans une boîte de Pétri de 3cm de diamètre, à  $10^6$  cells/mL, la bioconvection n'apparaît pas en dessous de 3mm de hauteur de suspension (environ 3mL)

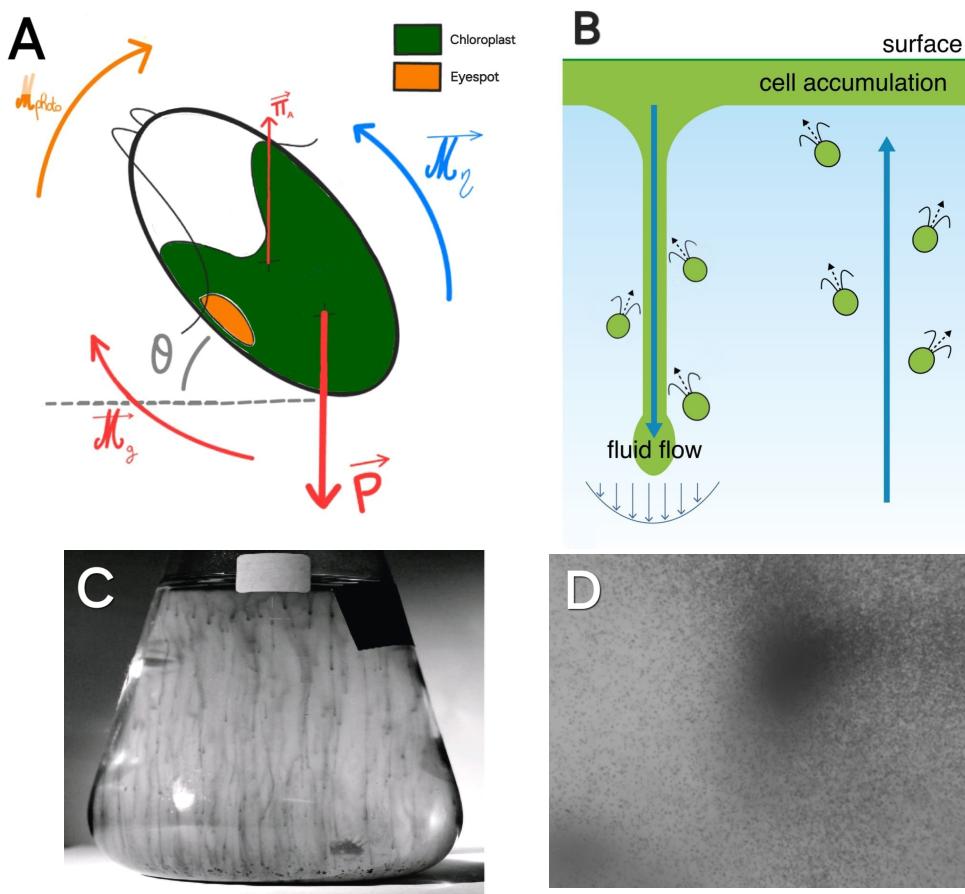


FIGURE 8 – **A** : Le couple gravitationnel (en rouge) est le principal responsable de la bioconvection, bien qu'il existe aussi des réorientations phototactiques, et des couples visqueux (gyrotaxie). La gyrotaxie [11] pourrait être à l'origine des couches minces de phytoplanctons à la surface de l'océan [12]. **B** : Bioconvection schématisée. **C** : Polypes de Taylor dans un erlenmeyer de 100mL [10]. **D** : Accumulation et polype de Taylor à l'image dans une boîte de Pétri de 3cm de diamètre. Concentration de  $10^5$  à  $10^6$  cells/mL dans une suspension de TAP, hauteur 4mm (4mL)

La bioconvection est un phénomène à éviter dans notre cas, car elle pollue l'image, la rend inexploitable en plus de perturber le milieu.

### 1.3 La photosynthèse

La photosynthèse est un processus bioénergétique essentiel par lequel les végétaux et certaines bactéries transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce mécanisme se déroule principalement dans les chloroplastes, où la chlorophylle reçoit l'énergie solaire captée par les caroténoïdes. La photosynthèse est cruciale pour la production de l'oxygène atmosphérique, soutenant ainsi la vie sur Terre, et elle peut se résumer par l'équation



où le dioxyde de carbone est converti en glucose et en dioxygène par oxydation de l'eau. De manière plus précise, l'oxydation de l'eau produit un flux d'électrons entre deux photosystèmes II et I, qui sont des assemblages de protéines et de pigments chlorophylliens. Ces électrons sont nécessaires aux réactions chimiques de la photosynthèse.

*Chlamydomonas reinhardtii* est photosynthétique, et on la soupçonne d'utiliser un produit ou l'énergie de la photosynthèse lors du processus d'adsorption. Pour tenter de le confirmer, on va par la suite inhiber complètement la photosynthèse de *C.reinhardtii* en bloquant le flux d'électrons au niveau du photosystème II, ainsi il est utile d'avoir en tête le schéma de fonctionnement de la photosynthèse qui est le suivant :

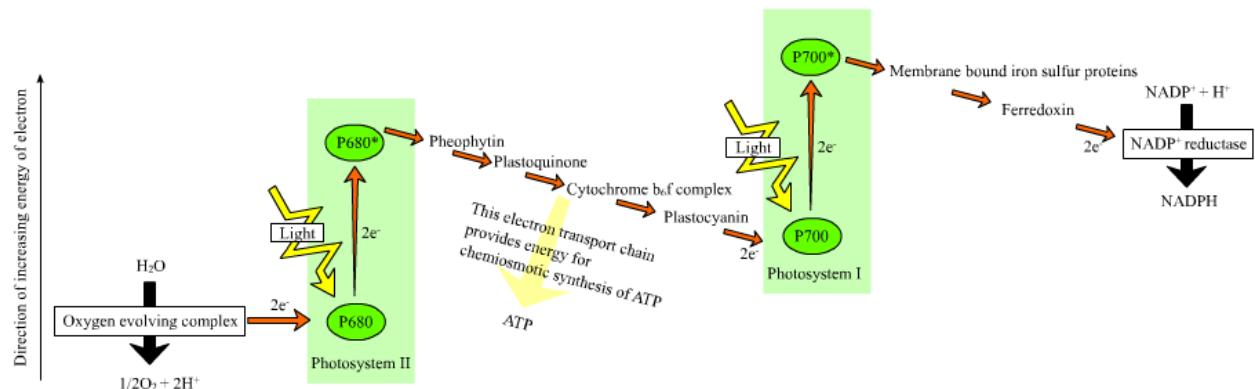


FIGURE 9 – Schéma en Z de la photosynthèse, issu de Wikipédia

### 1.4 La phototaxie

La phototaxie désigne le mouvement directionnel d'un organisme en réponse à la lumière. Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*, la phototaxie lui permet de fuir la lumière (phototaxie négative) ou de nager en sa direction (phototaxie positive). Grossièrement, on peut retenir que *C.reinhardtii* fuit la lumière si elle est trop intense, bien que les phénomènes en jeu soient plus complexes [13] (la micro-algue cherche aussi à optimiser sa photosynthèse).

A noter que CC125 a comme propriété d'être principalement négativement phototactique, ce qui ne pose aucun problème ici, au contraire (on étudie l'adsorption à l'interface liquide-air éclairée par le bas)



FIGURE 10 – Phototaxie négative au fond de boîtes de Pétri, lumière par le haut

#### 1.4.1 L'Eyespot

Comme chez beaucoup d'autres algues, *C.reinhardtii* est dotée d'un "oeil", le Eyespot (ou stigma) associé à la membrane plasmique au niveau de l'équateur de la cellule. Cet organelle est essentiel à la phototaxie : lorsqu'il est exposé à la lumière, les Channelrhodopsines (des photorécepteurs, qui existent de deux types, ChR1 et ChR2) qu'il contient s'activent et déclenchent une série de réactions biochimiques qui modifient le battement des flagelles, orientant ainsi le mouvement de la cellule vers ou à l'opposé de la lumière (phototaxie positive ou négative). L'eyespot contient aussi divers caroténoïdes (dont le bêta-carotène) qui lui donnent cette couleur orange brillante au microscope. La lumière arrivant face à l'eyespot, si elle n'atteint pas les photorécepteurs, a une deuxième chance de les atteindre par réflexion sur ces caroténoïdes. La lumière venant de l'opposé de l'eyespot, diffusée dans la cellule et focalisée sur l'eyespot par la symétrie sphérique, est réfléchie par les caroténoïdes. En ce sens, les caroténoïdes amplifient les rayons arrivant face à l'eyespot et le protègent des autres.

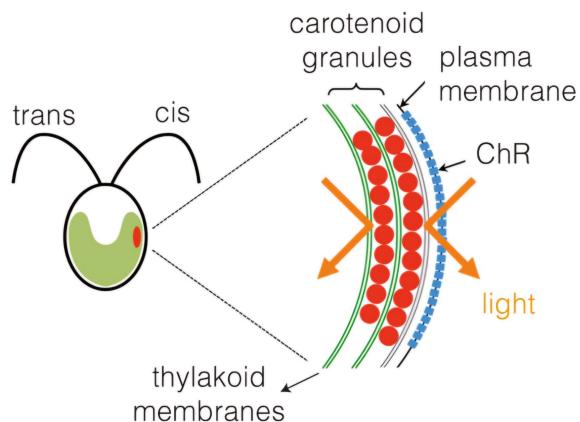


FIGURE 11 – Composition de l'Eyespot et rôle des caroténoïdes. Tiré de [14]

#### Mouvement hélicoïdal pour sonder l'environnement

Des études ont montré que *C.reinhardtii* nageait en suivant de longues trajectoires hélicoïdales d'environ  $50 \mu\text{m}$  de long, de quelques micromètres de rayon, et à la fréquence de 2 Hz, ce qui permet à son Eyespot de sonder l'environnement.

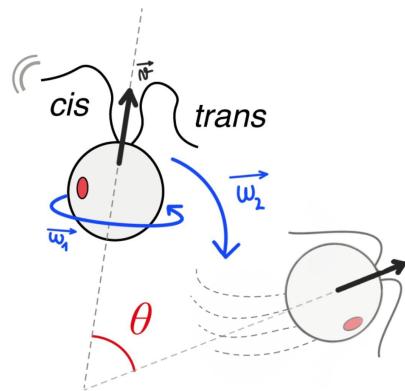


FIGURE 12 – Les flagelles ne battent pas dans les mêmes plans, inclinés d'environ 30° l'un par rapport à l'autre : cela crée un couple visqueux qui met l'algue en rotation sur elle-même. La flagelle "cis" (du côté de l'eyespot) bat légèrement plus fort que l'autre : l'algue est naturellement déviée du côté opposé. Ces deux effets aboutissent au mouvement hélicoïdal, stochastiquement interrompu par le Run and Tumble. Schéma adapté de [6]

### *C.reinhardtii* aveugle dans le rouge

Il est intéressant de noter que les photorécepteurs de *C.reinhardtii* n'absorbent pas dans le rouge, ce qui veut dire que placer un filtre rouge entre la source de lumière et les algues n'engendrera pas de réponse phototactique. C'est une idée qui sera utilisée par la suite.

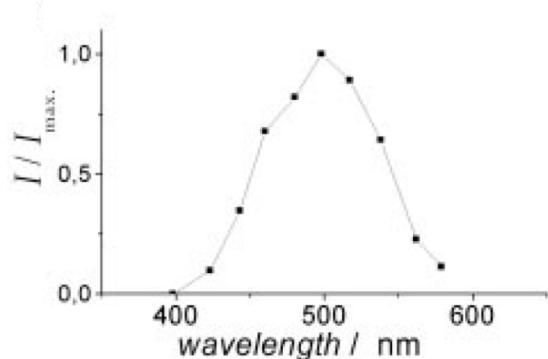


FIGURE 13 – Absorption des photorécepteurs. Tiré de [15]

## 2 Entretien des micro-algues et dispositif expérimental

### Point de départ : culture solide

Pour obtenir une population de *C.reinhardtii*, il a été nécessaire de préparer un milieu de culture solide, de l'agar contenant des nutriments essentiels et stérilisé, et d'y inoculer des cellules provenant de la souche CC125. Ensuite placées à la lumière dans un incubateur à 22-25°C, on peut les transférer au bout de quelques jours en milieu liquide dans un erlenmeyer (TAP, Tris Acétate Phosphate).

### Croissance de la population d'algues dans le TAP

La croissance d'une population d'algues varie beaucoup en fonction de la souche et du milieu notamment. L'allure de la courbe logistique ci-dessous donne un ordre d'idée de la croissance de notre population :

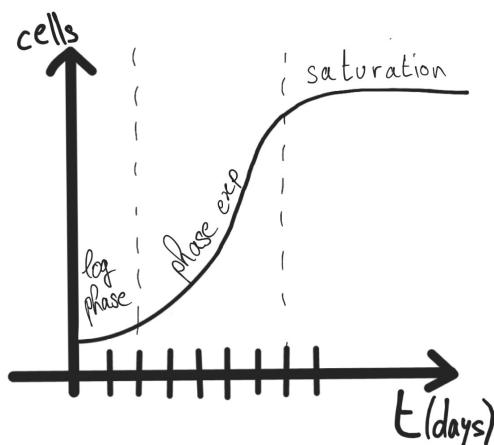


FIGURE 14 – Allure de la courbe logistique qui décrit la croissance des algues utilisées dans ce stage.

Quelques points importants :

- Nos algues se divisent généralement par **3**, chaque jour.
- À partir d'une certaine concentration, il n'y a plus assez de nutriments pour nourrir toute la population : la courbe atteint un plateau, il n'y a plus de division cellulaire.
- Les algues sont en meilleure forme au cours de la phase exponentielle, et on les veut en bonne forme et toujours à la même concentration pour faire les expériences : c'est pour cela qu'on dilue le milieu des algues par **3** d'un jour à l'autre, on se situe alors toujours dans cette phase exponentielle.
- Nos algues sont conservées dans un photo-incubateur à rotation orbitale (à 22-25°C, agitation 160 tr/min) éclairé le jour et dans le noir la nuit. La division cellulaire de nos algues est ainsi synchronisée selon un cycle circadien, et elle se déroule la nuit de ce même cycle pour que l'on puisse avoir les algues actives la journée pour les expériences (pour rappel, les algues ne nagent pas pendant la mitose car les flagelles sont impliquées dans le processus de division cellulaire !)



FIGURE 15 – Photo-incubateur avec agitation orbitale. Chaque erlenmeyer est marqué du jour, du propriétaire et du nom de la souche. Les erlenmeyer non agités ne sont pas de la veille et sont prêts à être lavés à l'eau de javel, puis jetés dans une poubelle à liquides basiques. Leurs populations sont saturées et en mauvaise santé, comme en témoigne la présence d'amas et la teinte verte foncée. Les tubes à essais sont les échantillons du jour et du jour seulement, qui peuvent donc être contaminés sans trop de risque (les bactéries n'ont pas le temps de nuire aux algues en une après-midi). Les erlenmeyer, eux, sont fermés hermétiquement par des bouchons en cellulose et ne sont jamais ouverts en dehors de la hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination.

## 2.1 Dilutions sous hotte à flux laminaire

Comme expliqué précédemment avec la courbe logistique, chaque matin la population d'algue est propagée et diluée par 3 pour avoir des algues en forme pour le lendemain. Pour éviter toute contamination, cette manipulation se déroule sous atmosphère stérile dans une hotte à flux laminaire :



FIGURE 16 – Hotte à flux laminaire



FIGURE 17 – Hors d'utilisation, sous lumière UV (qui apparaît bleu car son spectre déborde dans le visible)

A l'utilisation, la hotte se présente comme sur la Figure 16. Elle est à moitié fermée par une vitre en verre, et un flux d'air constant dirigé vers l'extérieur empêche l'entrée des bactéries. Avant toute dilution, l'intérieur de la hotte, les mains et le pistolet d'aspiration sont nettoyés à l'éthanol 70% (il s'avère qu'une concentration de 70% est plus efficace pour désinfecter). Les pipettes jaugées sont manipulées avec le pistolet d'aspiration, sans les toucher avec les mains. Les différents bouchons sont posés à l'envers, et jamais les mains ne doivent passer au dessus d'un bouchon ou d'une verrerie ouverte sous la hotte. Le plus souvent, 7mL d'algues sont pipetés dans 14mL de TAP pour propager, et quelques mL sont récupérés dans un tube Falcon pour les expériences du jour. Après utilisation, il est possible d'éclairer l'intérieur de la hotte à la lumière UV pour maintenir un environnement stérile (le plus souvent quand des cultures d'autres biologistes reposent sous la hotte).

## 2.2 Préparation du puits en PDMS pour la suspension de *C.reinhardtii*

Au début du stage, il a été imaginé d'observer *C.reinhardtii* dans des puits moulés en PDMS (Polydiméthylsiloxane). C'est un polymère très utilisé en microfluidique, pour plusieurs raisons : il est transparent dans le visible pour une observation au microscope, il est aisément moulé après réticulation, il est déformable et facile à percer avec des hole-punchers de différents diamètres, et il se colle de manière étanche sur une lame de verre avec l'aide d'un traitement au plasma à oxygène suivi d'une réaction catalysée par un simple chauffage [16].

Tout d'abord, de simples trous percés dans une couche de PDMS à l'aide de hole-punchers de quelques millimètre de diamètre pour y introduire des algues est une méthode qui a rapidement été écartée, à cause de problèmes de mouillages et d'un ménisque trop important (côtés flous à l'image au microscope). Il a alors été imaginé de mouler du PDMS dans des boîtes de Pétri de 3cm de diamètre, avec une colonne d'aimants de 1cm de diamètre au centre maintenue par des aimants sous la boîte. On veille à rajouter un passage dans la chambre à vide après avoir verser le PDMS dans la boîte autour de la colonne d'aimant, pour éviter que des bulles d'air se coincent entre le PDMS et la paroi rugueuse des aimants.

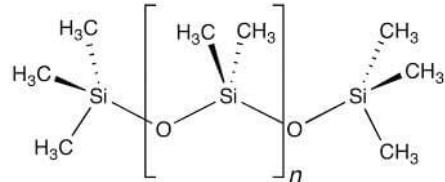


FIGURE 18 – PDMS (Polydiméthylsiloxane)

### Réticulation du PDMS

Non réticulé, le PDMS est un fluide très visqueux. Sa réticulation se déroule avec l'aide d'un agent réticulant (le *cross-linker*) à 1/10<sup>e</sup> de masse. Une étape de mélange à la spatule permet d'homogénéiser le cross-linker et préparer la formation des liaisons, la présence de bulles témoigne d'un mélange efficace. Après passage dans une chambre à vide jusqu'à disparition des bulles, le PDMS peut être disposé dans un moule pour avoir le puits avec les dimensions souhaitées. Le puits est prêt après quelques heures dans un four à 60-70°C (pas plus pour ne pas faire fondre le moule, qui est le plus souvent une boîte de Pétri)

### Plasma en salle blanche

Pour pouvoir coller de façon très étanche le puits à une lame de verre, un traitement au plasma a été réalisé en salle blanche. Celle-ci est une salle blanche pour des expériences de biophysiques, qui devrait se situer entre les normes de sécurité ISO 5 et ISO 7 (une sécurité extrême avec une norme ISO ≤ 4 n'est pas vraiment nécessaire). L'important est de garder une salle propre à l'aide d'une légère surpression à l'intérieur, maintenue par un SAS, où l'on s'équipe d'une blouse, de gants, et de protections pour les chaussures.



FIGURE 19 – Plaque sur laquelle sont disposés deux lames de verre et deux puits en PDMS, chacun à coller sur sa lame de verre.



FIGURE 20 – Le plasma est reconnaissable par sa couleur violette, qui témoigne ici sûrement de restes d'azote. Ce sont les photons émis par les désexcitations des atomes collisionnés en jeu qui donnent une couleur au plasma.

Dans le four à plasma, on se débarrasse d'abord de l'air en faisant le vide. On injecte ensuite de l'oxygène, puis on active un champ magnétique. Celui-ci va permettre de mettre en mouvement les atomes d'oxygène, qui ont le temps d'accumuler beaucoup d'énergie avant collisions grâce au vide effectué, donc grâce à un libre parcours moyen élevé. Le plasma génère chez les atomes d'oxygène des radicaux libres très réactifs, qui oxydent les surfaces du verre et du PDMS, créant des sites  $Si^{2+}$  pour la formation de fortes liaisons covalentes Si-O.

Après le passage par le four à plasma, on peut disposer les lames de verre avec leurs puits sur une plaque chauffante, pour catalyser et finir de créer les liaisons Si-O, afin d'avoir les puits en PDMS collés sur leurs lames de verre de façon très étanche.

**Une fois ce protocole suivi, le puits est enfin prêt.**

## 2.3 Panneau LED et microscope à focus continu pour l'acquisition des images

### Microscopie en champ clair (*brightfield microscopy*)

Les expériences ont lieu dans le dispositif expérimental décrit dans la page suivante, avec la Figure 21. L'observation est de type champ clair au microscope (cellules sombres sur fond clair). Dans les puits en PDMS, le volume de la suspension d'algue varie en fonction de la largeur du puits, allant de 40 à 300  $\mu L$  (ils peuvent être de quelques millimètres de diamètre percés aux hole-punchers dans du PDMS, ou ils peuvent avoir été créés comme en Figure 19). Les algues ont le plus souvent été observées dans des boîtes de Pétri de 3cm de diamètre, avec 2 mL de suspension (hauteur d'environ 2mm). La raison de ce choix est discutée en 2.3.1.

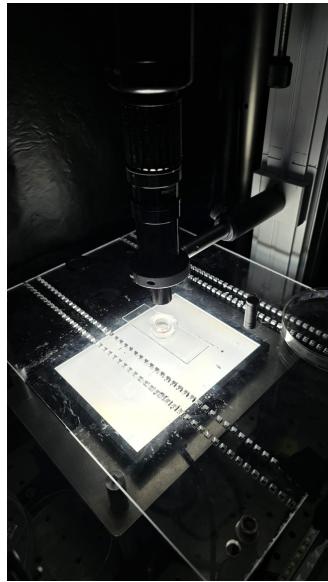


FIGURE 21 – La lumière du panneau LED (20cm x 15cm) est très directionnelle vers le haut. Le puits qui va contenir les algues est collé sur sa lame de verre, posée sur une paroi en plexiglas entre la LED et l'objectif du microscope. Si la suspension est dans une boîte de Pétri, celle-ci se place de la même façon sous le microscope. Le focus du microscope est réglable à l'aide de vis micrométriques, sur rails optiques ThorLabs.

Le fait que la lumière issue de la LED soit collimatée est important pour diriger la phototaxie sur la verticale, vers la surface liquide-air. La méthode d'imagerie est classique, en champ clair. Un boîtier réglable selon des valeurs allant de 0 à 255 permettait de régler l'intensité de la LED. Une caméra intégrée au microscope et commandée par une interface sur-mesure LabView, permet l'acquisition des images. Les images sont ensuite traitées sur MATLAB et ImageJ, dont on va parler dans la partie suivante.

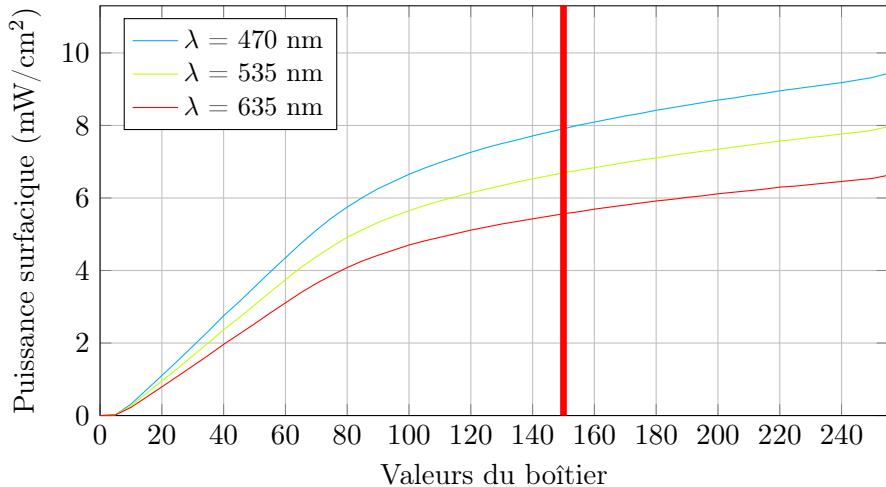


FIGURE 22 – Distribution en intensité de la LED à différentes longueurs d'onde (obtenue au Wattmètre, capteur de 9,5mm de diamètre).

A noter que les deux photorécepteurs du Eyespot de *C.reinhardtii* (les channelrhodopsines) ont un pic d'absorption à 470 et 500 nm. La valeur du boîtier choisie pour les mesures est 150. Elle correspond à environ 8 mW/cm<sup>2</sup> pour 470 et 500nm (une boîte de Pétri de 3cm de diamètre reçoit alors une cinquantaine de milliWatts, en supposant la LED parfaitement collimatée), elle devait être suffisante par rapport aux longueurs d'ondes d'absorption des photorécepteurs, condition qui est remplie. L'iris de l'objectif et le temps d'exposition (autour de 15-20ms) ont été réglés le mieux possible. L'intensité devait aussi être réglée pour limiter la condensation sur le PDMS servant de couvercle à la boîte de Pétri, ce qui a été un problème dans la suite.

### 2.3.1 Problèmes rencontrés

1. Différents volumes de la suspension y ont été introduits, en guise de tests : il fallait vérifier que les images étaient exploitables, c'est-à-dire vérifier l'absence de bioconvection, minimiser le ménisque (qui était trop important avec les trous aux hole-punchers) et assurer un mouillage suffisant.

Le mouillage devait être suffisant pour couvrir entièrement le fond du puits pour ne pas avoir qu'une simple goutte, tout en évitant trop d'épaisseur de liquide, ce qui pourrait induire de la bioconvection. Cet équilibre était déjà difficile à atteindre, et le ménisque demeurait problématique. Il était possible d'avoir quelques images, mais ce protocole avec les puits n'était pas optimal.

2. À l'air libre, la convection de l'air était extrêmement problématique à l'image (mouvements brusques des algues au voisinage de la surface). En plus de la convection de l'air, il y avait aussi des perturbations à cause des gradients thermiques, des gradients de tension de surface (effet Marangoni) et de la présence de vortex, qui sont des effets de second plan, négligeables devant la convection de l'air, qui n'ont pas encore été détectés à ce stade et dont on va reparler dans la suite.
3. On suspectait également une réflexion de la lumière sur l'objectif du microscope. Bien que sûrement très faible, elle ne peut que nuire à l'adsorption à la surface en engendrant une phototaxie potentiellement négative dans la direction opposée à la lumière collimatée.

### 2.3.2 Solutions

1. Le choix a été fait d'abandonner les puits en PDMS pour observer les algues au centre de boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre, là où l'interface apparaît plane à l'image (pas de problèmes de focus). Toutes les expériences ont donc été réalisées dans ces boîtes, avec 2 mL de suspension de *C. reinhardtii*, en l'absence de bioconvection. Le PDMS pour le moulage de puits reste un choix idéal dans la plupart des applications en microfluidique, seulement il apparaît que ce n'est pas une piste à suivre dans notre cas.
2. Le PDMS a tout de même servi de couvercle pour empêcher la convection de l'air.
3. Un filtre passe-bande dans le rouge ( $630 \pm 39$  nm) a été ajouté entre la suspension et l'objectif du microscope : les algues n'étant pas sensibles à la lumière rouge, on élimine ainsi tout problème potentiel de réflexion.

## 3 Dynamique d'adsorption de *Chlamydomonas reinhardtii* : traitement d'images et analyses statistiques

Cette partie traite principalement de l'analyse des données obtenues avec le dispositif expérimental précédemment décrit.

### 3.1 Programme de localisation des agrégats d'adsorption

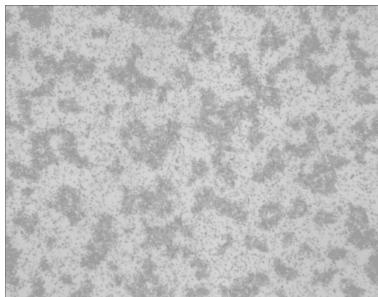
L'objet principal du stage est d'étudier la cinétique d'adsorption de *C.reinhardtii*. Pour ce faire, il fallait traiter les images prises par la caméra intégrée au microscope. La durée d'acquisition est généralement de 30-35 minutes (360 à 400 images, une image prise toutes les 5 secondes) pour permettre de suivre le mécanisme d'adsorption sur un temps suffisant. Un protocole de préexposition des algues à la lumière sera discuté dans la sous partie suivante. Ici, il s'agit de décrire la méthode permettant de repérer les algues adsorbées, et de suivre la surface totale adsorbée au cours du temps.

Supposons que l'on ait une séquence de 360 images de l'adsorption des cellules. L'imagerie est de type champ clair, les cellules apparaissent sombre sur fond clair. La méthode est la suivante : tout d'abord, un code MATLAB permet de soustraire le background de notre séquence d'images. Il prend

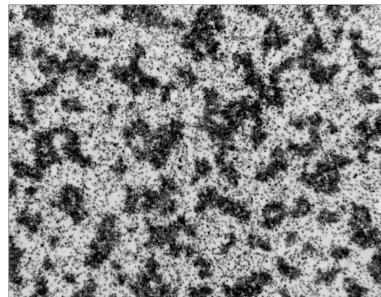
comme référence la première image de la séquence et, grâce à une boucle, met à jour cette référence en remplaçant les pixels par les valeurs maximales rencontrées dans chaque image suivante de la séquence. Cela permet de créer, in fine, une image de fond sans cellule. Ensuite, il suffit de soustraire cette image de fond à chaque image de la séquence pour obtenir les images avec le background éliminé. Cela permet d'avoir des images nettes et de préparer la localisation des agrégats.

Ensuite, les images sont converties en 8 bits et un threshold (seuillage) est appliqué. Il permet de mettre en valeur les agrégats. Après avoir inversé les couleurs, les cellules et les agrégats apparaissent blancs et leurs pixels ont comme valeur 255. Le fond apparaît noir, avec des pixels de valeur nulle.

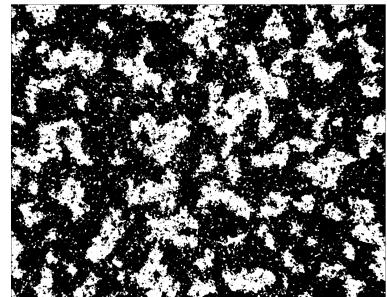
Le plugin Analyse Particles de ImageJ termine le travail : en imposant comme paramètre d'entrée "500-infinity (pixels)" il localise, sur chaque image, tous les amas de pixels blancs de surface supérieure à 500 pixels. Une cellule a un diamètre à l'image pouvant aller de 6 à 20 pixels, pour une surface de 30 à 300 pixels environ. En imposant une surface minimale de 500 pixels, avec un threshold bien ajusté, on est sûrs de ne pas localiser les cellules uniques, mais seulement les agrégats d'adsorption. ImageJ retourne, pour chaque agrégat détecté sur chaque image, une valeur de surface, la position X et Y, la solidité (mesure de la convexité), la circularité... Un code Python traite ensuite les données de Analyse Particle et peut exiger de nouveau des conditions sur la surface, la convexité et la circularité des objets par exemple, pour les détecter. L'ajustement de ces conditions se fait en fonction des images obtenues, et de la forme des agrégats à l'image brute pour optimiser les résultats de la détection.



(1) Image brute



(2) Background retiré



(3) Threshold + Invert

FIGURE 23 – Exemple avec agrégats d'adsorption



(1) Image brute



(2) Background retiré



(3) Threshold + Invert

FIGURE 24 – Exemple avec cellules non adsorbées

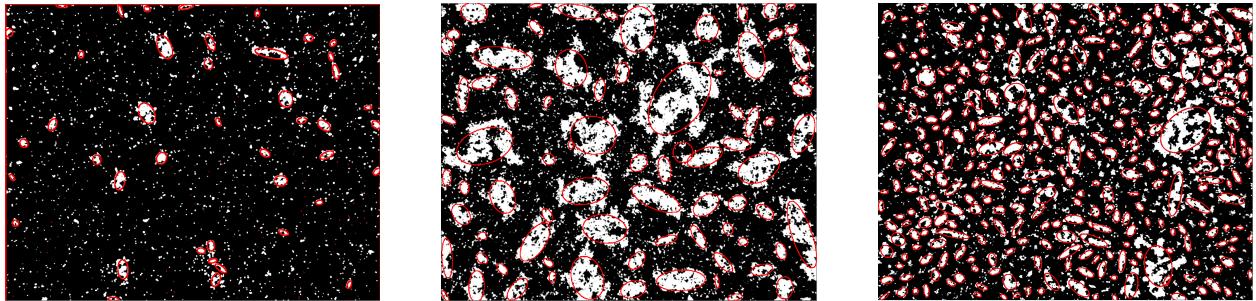


FIGURE 25 – Exemples de détection : les résultats sont très satisfaisants.

### 3.2 Problèmes rencontrés

#### 3.2.1 Liquéfaction sur la paroi intérieure du couvercle en PDMS

Le plus gros problème rencontré lors de l'analyse des images a été la condensation de la vapeur de liquide sur la paroi du PDMS, qui servait de couvercle aux boîtes de Pétri. En effet, cette condensation pouvait plus ou moins assombrir les images au fil du temps (diffusion par les gouttelettes), ce qui donnait des résultats catastrophiques après soustraction du background et application du threshold. Le code MATLAB n'était pas adapté pour suivre une telle variation d'intensité des pixels. La fonction "Substract background" intelligente de ImageJ donnait des résultats parfois corrects, mais bien loin de l'application du code MATLAB sur des images sans condensation.

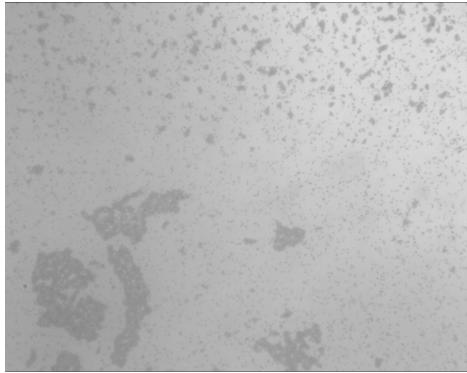


FIGURE 26 – Image brute, l'assombrissement dû à la condensation est bien visible

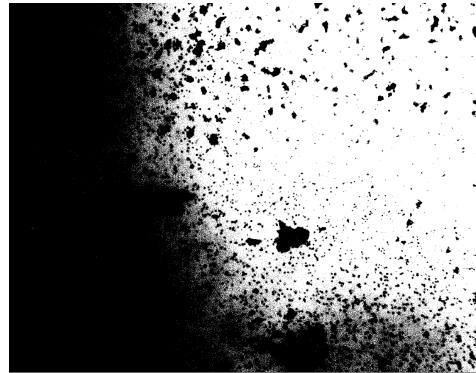


FIGURE 27 – Application du threshold : l'image est inexploitable.

#### Pression de vapeur saturante

Si la pression partielle de la phase vapeur  $P_{CR}$  de la suspension excède la pression de vapeur saturante  $P_{sat}(T)$  alors il y a liquéfaction (abusivement : condensation) pour revenir à un état d'équilibre. La relation de Clausius-Clapeyron fournit

$$\frac{dP_{sat}}{dT} = \frac{P_{sat}\Delta_{vap}H}{RT^2}$$

qui se réécrit

$$\frac{d \ln(P_{sat})}{dT} = \frac{\Delta_{vap}H}{RT^2}$$

La vaporisation étant un processus endothermique,  $\Delta_{vap}H > 0$ . Par croissance du logarithme, les deux fonctions de la température  $\ln(P_{sat})$  et  $P_{sat}$  sont croissantes.

**L'air chaud contient ainsi plus de vapeur d'eau que l'air froid. Pour ne rien arranger, il faisait très chaud en juillet...**

Le Handbook donne :  $\lambda_{PDMS} = 1,5 \cdot 10^{-1} \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  supérieur à  $\lambda_{air} = 2,4 \cdot 10^{-2} \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Or d'après la loi de Fourier  $j_{th} = -\lambda \vec{\nabla} T$ , orienté vers les températures décroissantes. La paroi du PDMS apparaît comme le "corps froid", la pression de vapeur saturante à son voisinage est plus faible que celle de l'air environnant la suspension. Il y a condensation sur le couvercle en PDMS ! Et cette buée gêne bel et bien le focus par diffusion/réfraction de la lumière par les gouttelettes.

A l'intensité de 150, le temps caractéristique de la condensation était de 30mins, ce qui posait parfois bien problème pour les dernières images de chaque séquences. A noter qu'à une intensité de 180, la condensation était trop difficile à gérer et les images étaient inexploitables : le temps caractéristique de condensation était de 5min. Augmenter l'intensité ne peut en effet que augmenter la condensation, les algues produisant sûrement plus d'oxygène par photosynthèse, saturant plus vite l'air au dessus de la suspension. Certaines expériences ayant déjà été faites à une intensité de 150, il a été choisi de maintenir cette valeur d'intensité, et de tenter de limiter la condensation en perçant des trous au hole-punchers sur le couvercle en PDMS, pour réguler la pression partielle de l'air au dessus de la suspension. Il n'était pas question de retirer le couvercle à cause de la convection. Cela a plus ou moins fonctionné, de la condensation pouvait apparaître mais les expériences ont pu être menées à bien.

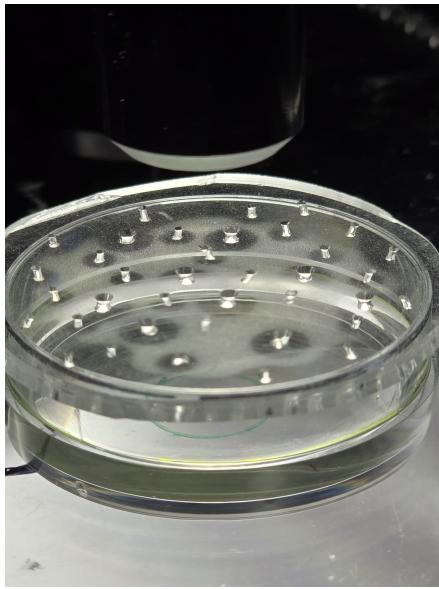


FIGURE 28 – Trous sur le couvercle en PDMS pour limiter la condensation.

### 3.2.2 Mouvement global d'origine peu claire

Le deuxième plus gros problème pour l'analyse d'image a été le mouvement global de la suspension sur chaque séquence d'image. La conséquence sur les graphes de cinétique est que le nombre d'agrégat et la surface totale adsorbée à l'image peut chuter, ou augmenter brutalement selon les agrégats qui partent ou arrivent à l'image dû à ce mouvement global.

1. La cause en est très probablement la convection thermique, qui, même faible, peut provoquer des déplacements significatifs. Ces déplacements sont régis par l'équation d'advection-diffusion thermique.

$$\frac{\partial T}{\partial t} + \vec{v} \cdot \vec{\nabla} T = D_{th} \Delta T$$

2. Il y a aussi probablement des effets de type Marangoni : toute zone de plus forte tension de surface tire davantage sur le liquide. La tension de surface  $\gamma$  étant une fonction de la température, des gradients de température peuvent provoquer des gradients de tension de surface, ce qui génère des écoulements. L'ajout de surfactants, qui modifient localement la tension de surface, est une idée intéressante pour l'étude de l'adsorption de *C.reinhardtii*. Et

des gradients de concentration en surfactant peuvent bien sûr provoquer des gradients de tension de surface, ce qui fait de l'effet Marangoni un effet à ne pas négliger dans ce cadre.

3. Enfin, des "puits gravitationnels" peuvent également être à l'origine de cette observation. Si un amas d'algues important se situe à un endroit, il peut agir comme un vortex, attirant les autres algues et agrégats à proximité. Cela a pu être observé très clairement une fois sur une séquence d'images : à mesure qu'un amas d'adsorption grandissait, les agrégats autour de lui étaient freinés dans leur course jusqu'à s'arrêter et être attirés vers l'amas central :

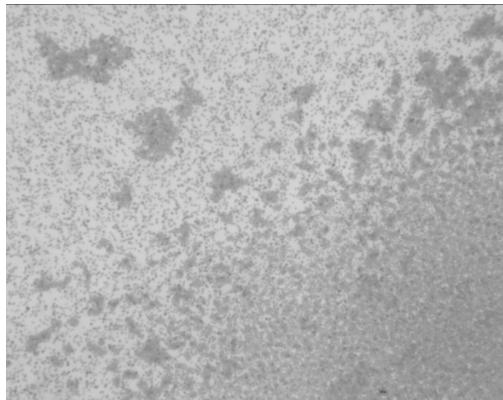


FIGURE 29 – L'amas d'adsorption visible au Sud-Est attire les agrégats situés autour

### 3.3 Protocoles de préacquisitions

Il s'agissait d'essayer de déterminer le protocole optimal pour les algues juste avant leur placement sous l'objectif. Divers tests ont tout d'abord montré qu'une préexposition à la lumière donnait le plus souvent de meilleurs résultats d'adsorption par rapport à une isolation dans le noir des algues avant l'observation. Comme si la lumière les préparait.

Maintenant, la question est de savoir combien de temps à peu près il fallait les laisser sous la lumière de l'incubateur avant de les observer. Jusqu'à 7 boîtes de Pétri (Figure 10) ont été placés à la lumière dans l'incubateur. Une première boîte a directement été placé sous l'objectif du microscope, à la caméra, juste après le pipetage des 2 mL d'algues, pour 30 mins d'acquisition. Et toutes les 30mins, une boîte de Pétri était sortie de l'incubateur et placée à la caméra pour de nouveau 30 mins d'acquisition. Cela fait une préexposition à la lumière de 0mins à 3h, avec un pas de 30mins.

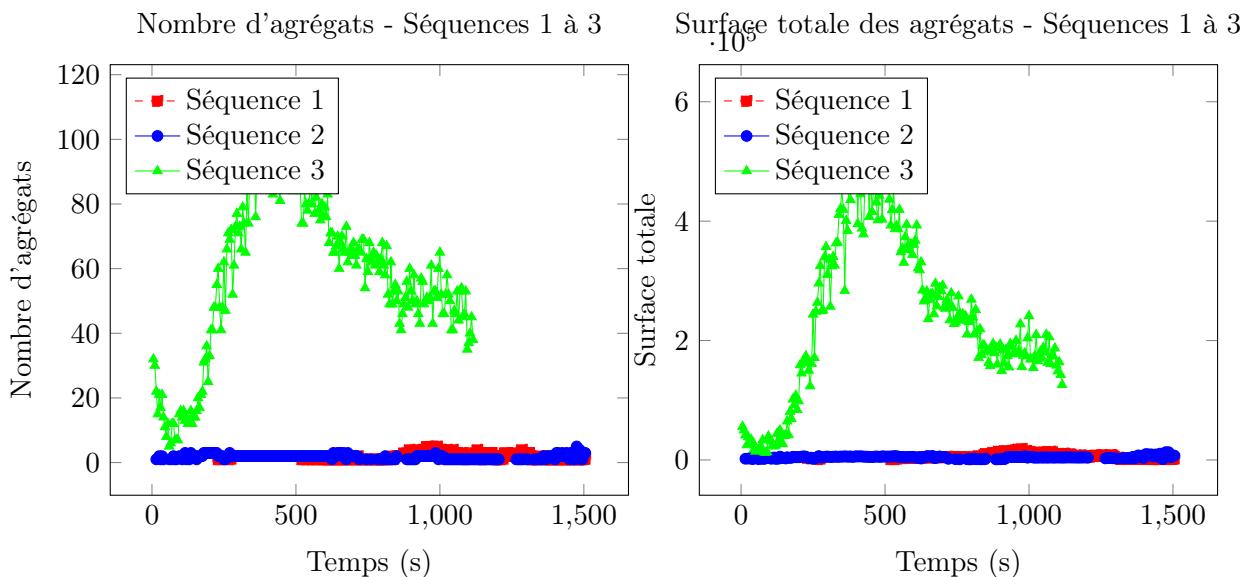


FIGURE 30 – Séquences 1 à 3

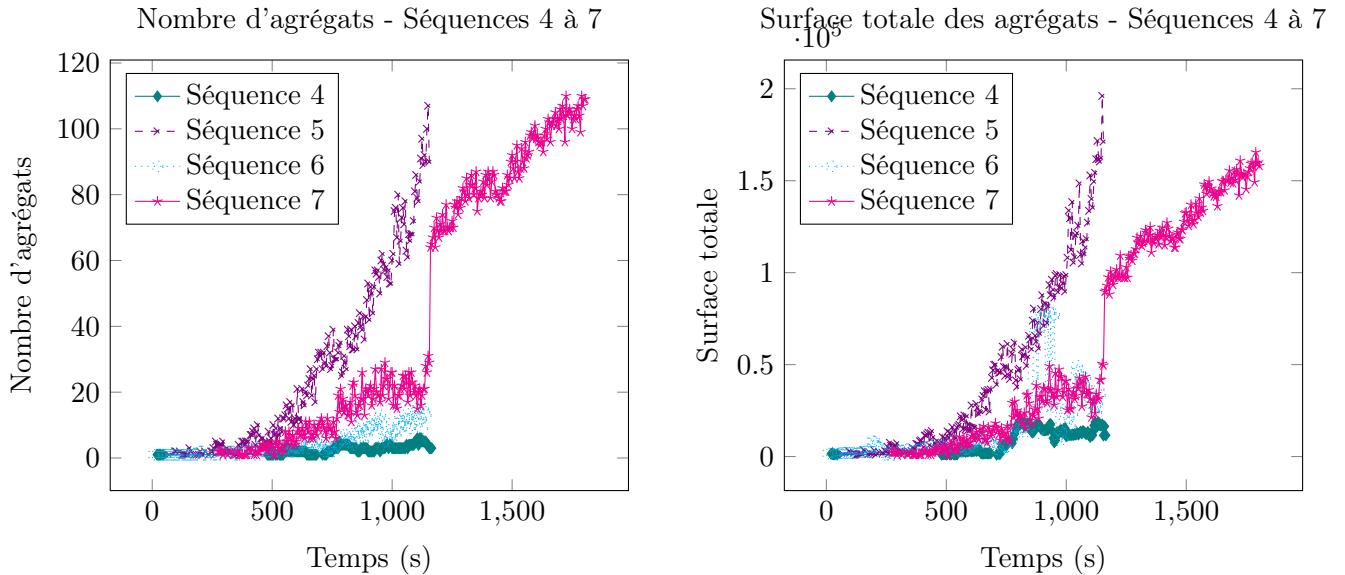


FIGURE 31 – Séquences 4 à 7

Cette même expérience a été répétée 3 fois, sur 3 jours : voir Annexe 3.2.1 pour d'autres résultats. Les résultats sont clairs pour les 3 premières séquences (Figure 30) : une exposition d'1h donne de meilleurs résultats qu'une exposition moindre. Concernant les séquences 4 à 7 (Figure 31), c'est à chaque fois plus difficile à interpréter, mais il semblerait qu'une exposition ne dépassant pas 2h soit recommandée. Au bilan, il est recommandé de préexposer les algues à la lumière pendant une à deux heures avant d'observer leur adsorption au microscope.

**On retient comme protocole une préexposition de 1 à 2 heures.**

### 3.4 Lien entre photosynthèse et adsorption fortement suspecté

On soupçonne les algues de sécréter un produit lors de leur adsorption. Il pourrait provenir de la photosynthèse, ainsi il a été pensé de jouer sur l'activité photosynthétique des algues, et de regarder la réponse d'adsorption.

#### 3.4.1 Réduction de l'adsorption par inhibition de la photosynthèse

**Le DCMU, inhibiteur de la photosynthèse.**

Le DCMU est un inhibiteur de la photosynthèse, dans le sens où il bloque le gradient d'électrons produit par l'oxydation de l'eau au niveau du photosystème II [17] De surcroît, le photosystème I est également hors d'état puisque les réactions qui s'y produisent nécessitent l'apport d'électrons. La photosynthèse ne fonctionne plus.

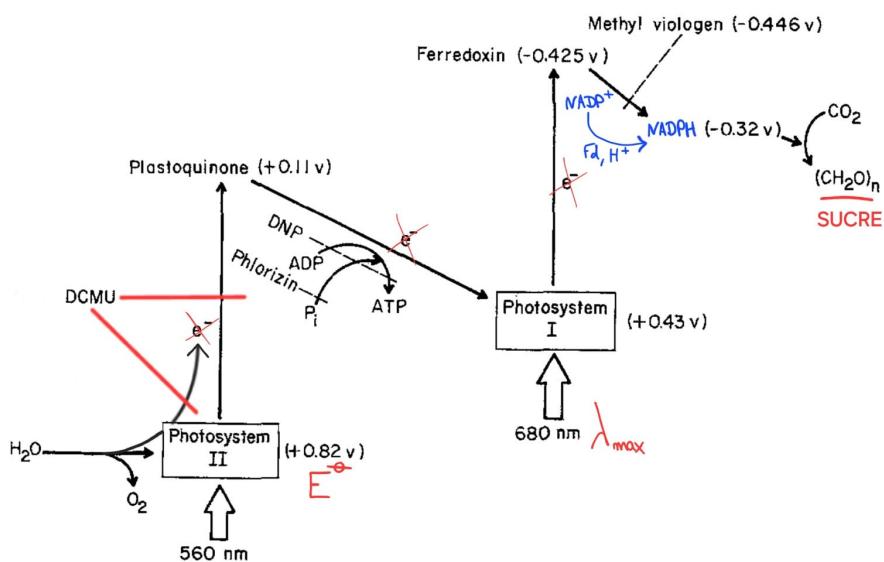


FIGURE 32 – Mode d'action du DCMU sur le processus de photosynthèse, adapté de [17]. Voir aussi la Figure 9 pour le schéma en Z de la photosynthèse

Dans une thèse de Isabelle EISENMANN "Phototaxis and collective phenomena in the motile micro-alga *Chlamydomonas reinhardtii*" [6], le DCMU a été ajouté pour étudier l'influence de la concentration en  $CO_2$  dans une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, après son addition les algues ne photosynthétisent plus donc ne peuvent plus convertir ce dioxyde de carbone en dioxygène. Donc sa concentration ne devrait plus diminuer, elle devrait même augmenter. [6] Il a été imaginé ici de comparer la cinétique d'adsorption avec et sans DCMU, donc avec et sans photosynthèse à priori. Le DCMU a été ajouté dilué au 1000<sup>e</sup>, 2  $\mu$ L ont été ajoutés (à la pipette Eppendorf) aux 2 mL d'algues.

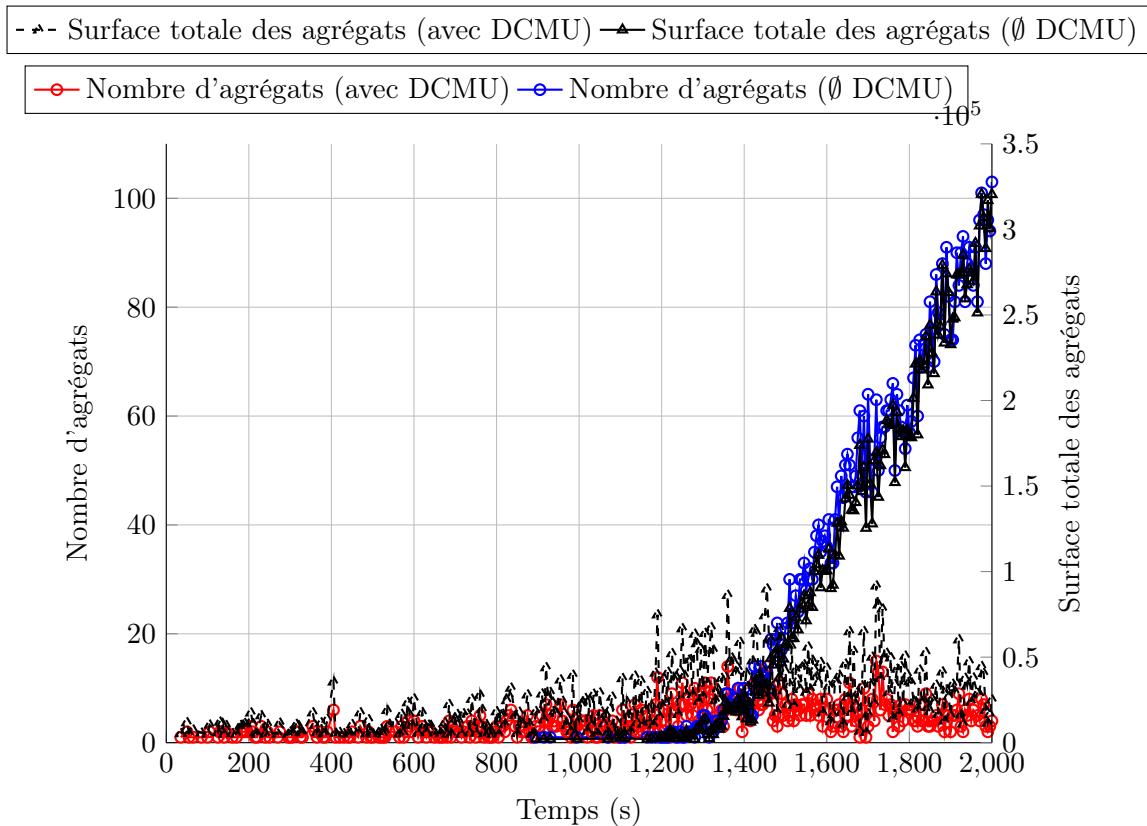


FIGURE 33 – Évolution du nombre d'agrégats et de leur surface totale avec et sans DCMU

Les résultats sont sans appel : l'expérience a été menée plusieurs fois (voir la Figure ?? de l'annexe C), et à chaque fois, l'adsorption est significativement plus importante en l'absence de DCMU.



FIGURE 34 – Avec DCMU

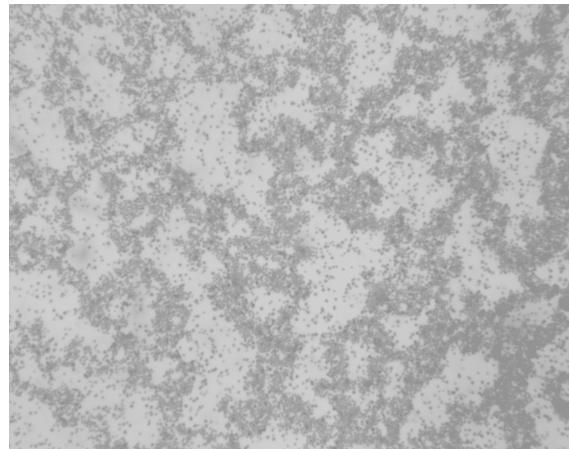


FIGURE 35 – Sans DCMU

### 3.4.2 *C.reinhardtii* en milieu minimal au profit de la photosynthèse

Les résultats précédents suggèrent que la photosynthèse joue un rôle important dans le processus d'adsorption.

**Cependant, on ne peut pas conclure si vite : les algues peuvent utiliser l'acétate du TAP comme source d'énergie, et pourraient ainsi réduire leur activité photosynthétique. On pense alors à les étudier dans un milieu minimal, du TAP privé d'acétate.**

Un tube Falcon d'algues a alors été passé à la centrifugeuse. Après 12 minutes de centrifugation, les algues, plus denses que le liquide dans lequel elles baignent, se sont accumulées au fond du tube Falcon pour former un pellet. Le surnageant (le TAP) a ensuite été pipeté et remplacé par du milieu minimal. Il n'y avait pas vraiment besoin de répéter la centrifugation pour s'assurer de la disparition du TAP, puisque les algues allaient rapidement consommer l'acétate potentiellement résiduel. Deux boîtes de Pétri de 2mL d'algues, une de milieu minimal et une de TAP, ont été placées 2h à la lumière de l'incubateur (selon les indications trouvées précédemment) puis placées pour 30mins d'images sous le microscope et la caméra. Ci-dessous les dernières images obtenues :

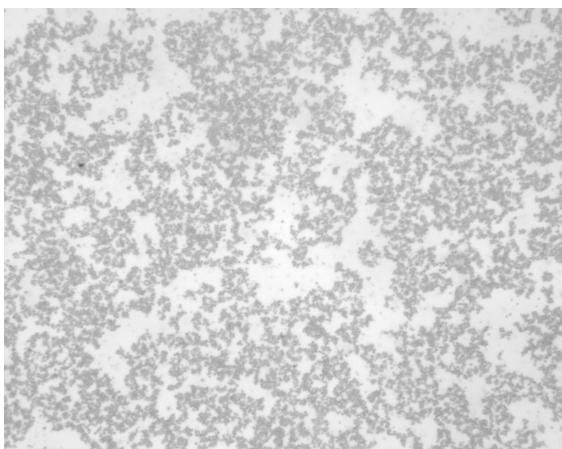


FIGURE 36 – Adsorption en milieu minimal

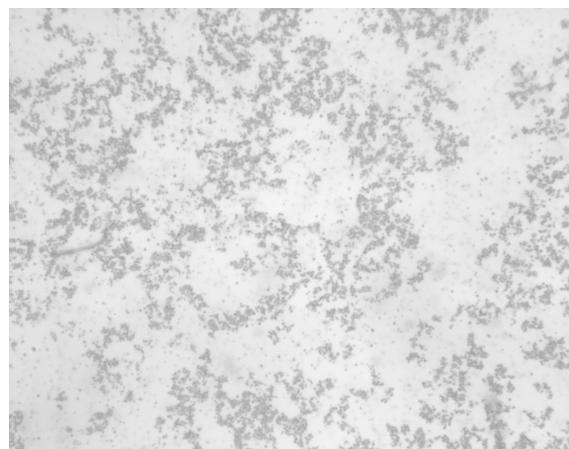


FIGURE 37 – Adsorption en milieu TAP

L'adsorption est significativement meilleure dans le milieu minimal. D'autres manipulations ont aussi montré une tendance globale pour le milieu minimal à présenter plus d'adsorption que dans le TAP.

Ces manipulations solidifient l'hypothèse selon laquelle la photosynthèse jouerait un rôle dans l'adsorption. De plus, le milieu minimal semble plus adapté pour étudier l'adsorption de *C.reinhardtii* : l'adsorption y est accrue.

### 3.5 Tests d'altération de l'environnement de *C.reinhardtii*

D'autres tests d'ajout de produits dans l'environnement de *C.reinhardtii* ont été expérimentés, et qui sont intéressants de présenter.

#### 3.5.1 Ajout de glucose

Le glucose est censé favoriser la respiration cellulaire, l'idée était de l'utiliser pour étudier l'effet de la concentration en dioxygène. Deux protocoles ont été comparés : une situation de préexposition à la lumière, sans glucose (réplétion de dioxygène par photosynthèse, voir 1.3) et une situation dans le noir, avec couvercle (les micro-algues basculent leur métabolisme de production d'énergie de la photosynthèse vers la respiration aérobie, donc déplétion de dioxygène par respiration [18]). Rien de particulier n'a été observé, si ce n'est que c'est la dose qui fait le poison : 0,05g/mL suffisent pour que les algues perdent/rétracent leurs flagelles, elles ne nagent donc plus. L'expérience aurait mérité des temps de préparation plus longs, qui auraient été bien appuyés par un capteur à dioxygène.

#### 3.5.2 Ajout de PVA

Le PVA est un polymère, qui se présente sous la forme de cristaux à taux d'hydrolyse suffisamment élevé.

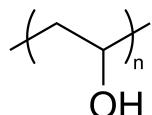


FIGURE 38 – Alcool polyvinyle (PVA)

Son ajout à différentes concentrations (0,1g/100mL ; 0,1g/50mL ; 0,1g/25mL ; 0,1g/10mL) abouti toujours strictement à la même conclusion : il n'y a pas d'adsorption (ou extrêmement peu, quelques agrégats sur toute la surface de la suspension). Cela est certainement dû à de la gène stérique, le PVA dissout se présente dans la suspension comme de longues chaînes carbonées qui gêne les algues à l'adsorption.

#### 3.5.3 Un surfactant, le C12TAB

Le C12TAB est un surfactant (tensioactif) **cationique** : il est doté d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Les molécules de C12TAB vont naturellement se placer à l'interface, la queue hydrophobe qui pointe dans l'air et la tête hydrophile vers le liquide (qui se ressemble s'assemblent). Les molécules de liquide à la surface n'interragissent plus qu'avec leurs semblables, elles ne voient plus les molécules de l'air au voisinage de l'interface. Il en résulte une diminution de l'énergie de surface. Il était alors intéressant de voir l'effet du C12TAB sur l'adsorption.

Avant de l'ajouter, il fallait calculer la concentration à ajouter afin d'éviter la formation de micelles :

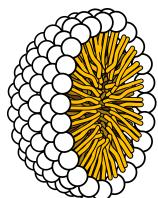


FIGURE 39 – Micelle

La concentration maximale en question s'appelle la concentration micellaire critique (CMC). A noter que chez les surfactants, les micelles ne peuvent apparaître que si la température est supérieure à la température de Krafft, qui vaut 25°C pour le C12TAB [19]. En juin-juillet, il était alors important de ne pas dépasser cette CMC. Pour le C12TAB, elle vaut  $10^{-2}$  mol ·  $L^{-1}$ .

### Ajout de C12TAB par forte dilution

Néanmoins, même à très faible concentration (1% de la CMC,  $10^{-4}$  mol ·  $L^{-1}$ ) les algues sont neutralisées, elles ne nagent plus : elles ont perdues/rétrécies leurs flagelles, ou sont mortes : c'est peut être dû au fait que ce surfactant est cationique.

**L'ajout de surfactants reste une piste très intéressante à suivre dans le futur pour l'étude de l'adsorption de *Chlamydomonas reinhardtii*, et qui aurait méritée plus de temps à consacrer. Il faudrait utiliser d'autres surfactants avec des propriétés physico-chimiques différentes de celles du C12TAB, par exemple chargés différemment (surfactants neutres ou anioniques)**

#### 3.5.4 Ajout de silice

Il s'avère que l'altération de la concentration en silice d'un milieu, par privation ou enrichissement, peut jouer sur la production de phospholipides des algues [20] [21]. Dans l'hypothèse où c'est ce produit que les algues sécrètent lors de l'adsorption, la présence de silice devrait alors entraîner une meilleure adsorption à l'interface. Plusieurs concentrations de sodium métasilicates  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ont été essayées, sans résultats concluants. A noter que là encore, la dose fait le poison. Une situation de carence en azote devrait également favoriser la production de phospholipides [20], c'est une expérience à essayer dans le futur.

## Conclusion et perspectives

Des expériences, nous pouvons retenir qu'il est important de stimuler les algues avant de les observer au microscope. Les résultats semblent préconiser une préexposition à la lumière de 1 à 2 heures. Aussi, on a réussi à montrer qu'il était clair que la qualité de l'adsorption ait un lien avec l'activité photosynthétique. Les résultats de l'action du DCMU ont permis de mettre en lumière cette piste, et les résultats du changement du milieu TAP en milieu minimal censé augmenté l'activité photosynthétique ne fait que corroborer l'hypothèse. Pour poursuivre, étudier l'ajout de différents surfactants avec différentes propriétés physico-chimiques (plutôt neutres ou anioniques, les algues semblent ne pas aimer les surfactants cationiques, voir 3.5.3) et s'intéresser plus en détails aux rôles des produits de la photosynthèse sont des pistes très intéressantes et prometteuses, qui pourront s'appuyer sur les résultats établis dans ce rapport.

## Annexe A

Code pour le temps caractéristique de désynchronisation des flagelles dans le Run and Tumble motion, sur une séquence de 1000 images (environ 1 minute)

```

1 # Tracking sur 1min
2 chemin_csv_2 = '/Users/romain/Desktop/STAGE/PYTHON/POISSON/tracking SPOTS.csv',
3
4 data = pd.read_csv(chemin_csv_2)
5
6 # Conversion des données en float ou int (sinon Python retourne une erreur)
7 data['FRAME'] = pd.to_numeric(data['FRAME'], errors='coerce')
8 data['TRACK_ID'] = pd.to_numeric(data['TRACK_ID'], errors='coerce')
9 data['POSITION_X'] = pd.to_numeric(data['POSITION_X'], errors='coerce')
10 data['POSITION_Y'] = pd.to_numeric(data['POSITION_Y'], errors='coerce')
11
12 # Paramètres
13 time_per_frame = 5

```

```

14 angle_threshold = 10 # threshold angle
15 immobile_threshold = 60 # threshold pour éliminer particules sans flagelles
16
17 # Calcul du déplacement
18 def distance(df):
19     df['dX'] = df['POSITION_X'].diff()
20     df['dY'] = df['POSITION_Y'].diff()
21     df['distance'] = np.sqrt(df['dX']**2 + df['dY']**2)
22     return df
23
24 def calcul_angle(df):
25     df['angle'] = np.arccos((df['dX'] * df['dX'].shift(-1) + df['dY'] * df['dY'].shift(-1)) /
26     / (df['distance'] * df['distance'].shift(-1))) * 180 / np.pi
27     return df
28
29 # Appliquer la fonction à chaque TRACK_ID (chaque particule)
30 data['dX'] = np.nan
31 data['dY'] = np.nan
32 data['distance'] = np.nan
33 data['angle'] = np.nan
34 for track_id in data['TRACK_ID'].unique():
35     data.loc[data['TRACK_ID']==track_id] = distance(data.loc[data['TRACK_ID'] == track_id])
36     data.loc[data['TRACK_ID']==track_id]=calcul_angle(data.loc[data['TRACK_ID']]==track_id))
37
38 # Déterminer les particules sans flagelle (qui ne nagent pas)
39 total_displacements = data.groupby('TRACK_ID')['displacement'].sum()
40 mobile_particles = total_displacements[total_displacements > immobile_threshold].index
41
42 # Les éliminer
43 filtered_data = data[data['TRACK_ID'].isin(mobile_particles)]
44
45 # Déterminer les changements de direction
46 filtered_data['change_of_direction'] = filtered_data['angle'] > angle_threshold
47
48 # Calculer les durées entre les changements de direction pour chaque TRACK_ID (particule)
49 durations = []
50 change_frames_and_particles = []
51 for track_id in filtered_data['TRACK_ID'].unique():
52     track_data = filtered_data[filtered_data['TRACK_ID'] == track_id]
53     change_frames = track_data[track_data['change_of_direction']]['FRAME'].values
54     change_times = change_frames * time_per_frame
55     durations.extend(np.diff(change_times))
56     change_frames_and_particles.extend(zip(change_frames, [track_id]*len(change_frames)))
57
58 # Espérance et écart-type de la distribution Poissonienne.
59 ecart_type = np.nanstd(durations)
60 moyenne_temps = np.mean(durations)
61 print(f"Duree moyenne de changement de direction: {moyenne_temps:.2f} secondes")
62
63 # Afficher les frames et particules avec changement de direction,
64 # pour comparer à la séquence d'image
65 print("Frames et particules avec changement de direction:")
66 for frame, particle in change_frames_and_particles:
67     print(f"Frame: {frame}, Particule: {particle}")
68
69
70 # Puis lignes de code matplotlib pour afficher les plots.

```

Code qui détermine la vitesse moyenne des cellules, suivies individuellement sur une séquence d'environ 1min :

```

1
2
3 vitesses_trackmate = '/Users/romain/Desktop/STAGE/PYTHON/vitesse_chlamy.csv'
4 data = pd.read_csv(vitesses_trackmate)
5
6
7 # Filtrer les particules par taille
8 min_area = 30
9 max_area = 300
10 df1 = data[data['Area'] > min_area]
11 df= df1[df1['Area']< max_area]
12
13 # Trier les données par Slice pour faciliter le traitement
14 df = df.sort_values(by='Slice').reset_index(drop=True)
15

```

```
16 # Initialisation des listes pour les resultats
17 tracked_particles = []
18
19 # Creer un KDTree (k-dimensionnal tree) pour les positions de chaque image,
20 # c'est utilise pour associer les particules entre les images successives
21 # en trouvant les particules les plus proches dans l'image suivante.
22
23 def create_kdtree(data):
24     return cKDTree(data[['XM', 'YM']].values)
25
26 # Calculer l'angle entre deux vecteurs
27 def calculate_angle(v1, v2):
28     dot_product = np.dot(v1, v2)
29     norm_v1 = np.linalg.norm(v1)
30     norm_v2 = np.linalg.norm(v2)
31     cosine_angle = dot_product / (norm_v1 * norm_v2)
32     angle = np.arccos(np.clip(cosine_angle, -1.0, 1.0)) #eviter erreurs num
33     return np.degrees(angle)
34
35 # Associer les particules entre les images successives
36 def associate_particles(df):
37     unique_slices = df['Slice'].unique()
38     prev_positions = None
39     prev_slice = None
40
41     for slice_num in unique_slices:
42         current_data = df[df['Slice'] == slice_num]
43         if prev_positions is not None:
44             # Creer un KDTree pour les positions de l'image actuelle
45             tree = create_kdtree(current_data)
46
47             for i, prev_row in prev_positions.iterrows():
48                 pos = np.array([prev_row['XM'], prev_row['YM']])
49                 dist, idx = tree.query(pos)
50
51                 if dist < 10: # seuil de proximite en pixels
52                     current_row = current_data.iloc[idx]
53
54                     if prev_slice is not None:
55                         # Calculer le vecteur precedent et actuel
56                         prev_vector=np.array([prev_row['XM'] - prev_positions['XM'].mean(),
57                         prev_row['YM'] - prev_positions['YM'].mean()])
58                         current_vector = np.array([current_row['XM'] - prev_row['XM'],
59                         current_row['YM'] - prev_row['YM']])
60
61                         # Calculer l'angle entre les vecteurs du mouvement
62                         angle = calculate_angle(prev_vector, current_vector)
63
64 # seuil pour considerer ligne droite
65             if angle < 2 or angle > 178:
66                 tracked_particles.append({
67                     'Prev_Slice': prev_slice,
68                     'Current_Slice': slice_num,
69                     'Prev_XM': prev_row['XM'],
70                     'Prev_YM': prev_row['YM'],
71                     'Current_XM': current_row['XM'],
72                     'Current_YM': current_row['YM'],
73                     'Area': prev_row['Area']
74                 })
75
76             # Maj des donnees pour le prochain tour
77             prev_positions = current_data
78             prev_slice = slice_num
79
80 # Associer les particules
81 associate_particles(df)
82
83 # Convertir tracked_particles, un dictionnaire, en lignes et colonnes
84 particles_df = pd.DataFrame(tracked_particles)
85
86 # Calculer les distances parcourues en pixels
87 particles_df['Distance']=np.sqrt((particles_df['Current_XM'] - particles_df['Prev_XM'])**2
88 + (particles_df['Current_YM'] - particles_df['Prev_YM'])**2)
89
90 # Estimer la taille moyenne d'une particule (moyenne sur les Area)
91 mean_area = df['Area'].mean()
92 particle_diameter_pixels = np.sqrt(mean_area / np.pi) * 2
```

```

93 conversion_factor = 10 / particle_diameter_pixels # 10 um cell diameter
94
95 # Convertir les distances en micrometres
96 particles_df['Distance_micrometers'] = particles_df['Distance'] * conversion_factor
97
98 # Calculer la vitesse
99 time_interval_seconds = 0.05 # 0.05 secondes entre chaque image
100 particles_df['Speed_micrometers_per_second'] = particles_df['Distance_micrometers'] /
101 / time_interval_seconds
102
103 # Filtrer les particules dont le deplacement total est inferieur a 40 micrometres
104 total_displacements = particles_df.groupby(['Prev_XM', 'Prev_YM', 'Current_XM',
105 'Current_YM'])['Distance_micrometers'].sum()
106 valid_particles = total_displacements[total_displacements >= 3].index
107
108 particles_df = particles_df[particles_df[['Prev_XM', 'Prev_YM', 'Current_XM',
109 'Current_YM']].apply(tuple, axis=1).isin(valid_particles)]
110
111 # Vitesse moyenne
112 mean_speed = particles_df['Speed_micrometers_per_second'].mean()
113 print(f"Vitesse moyenne des particules : {mean_speed:.2f} micrometres par seconde")
114
115 # Enregistrer les vitesses dans un fichier CSV pour OVERLEAF
116 # data_latex = '/Users/romain/Desktop/STAGE/PYTHON/vitesses_particules.csv'
117 # particles_df[['Speed_micrometers_per_second']].to_csv(data_, index=False)
118
119 # Puis un code matplotlib pour afficher l'histogramme des valeurs de vitesse.

```

## Annexe B

Code MATLAB pour créer un background à soustraire à la séquence d'image associée :

```

1 nframe=401;
2 for m=1:1
3 %     ninit=(m-1)*Nback;
4 %     basepath=['C:\Users\manip\Documents\Romain\240625\AVEC DCMU\'];
5 %     nom=[basepath 'img_' num2str(0,'%04i') '.tif'];
6 %     back=imread(nom);
7 %     % back=mean(back,3);
8 %
9
10 %     for i=ninit+1:ninit+Nback-1
11 %         for i=1:nframe
12 %             nom=[basepath 'img_' num2str(i,'%04i') '.tif'];
13 %             img=imread(nom);
14 %             test=double(back)-double(img);
15 %             a=find(test<0);
16 %             back(a)=img(a);
17 %             if mod(i,50)==0
18 %                 disp(i)
19 %             end
20 %         end
21 %     end
22 %
23 %     back=uint8(back);
24 %     nom=[basepath 'background_MAX.tiff'];
25 %     imwrite(back,nom);
26 %     m
27 end

```

Un autre code servait pour du tracking mais a été peu utilisé.

## Annexe C

L'expérience discutée en 3.3 a été réalisée trois fois sur trois jours différents, ci-dessous les résultats d'une autre série d'acquisitions.

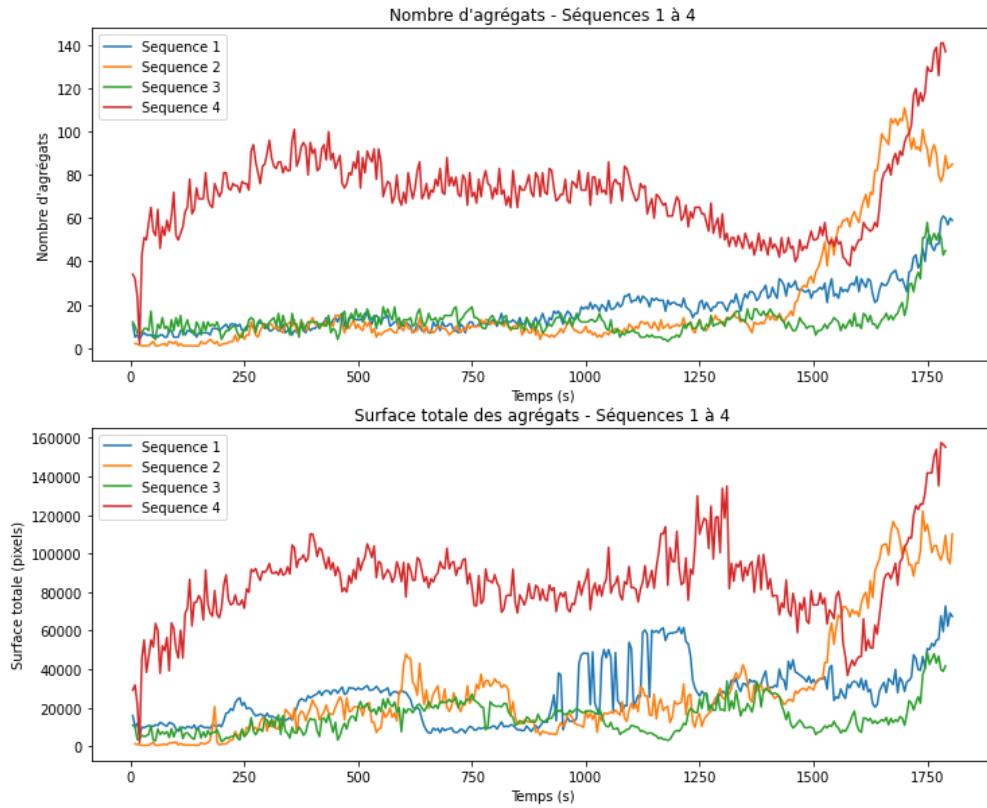


FIGURE 40 – Séquences 1 à 4 du protocole de préacquisition à la lumière. Pour la séquence 1, les algues ont été exposées 0min à la lumière. Pour la séquence 2 30mins, pour la séquence 3 1h, etc. Les variations brutales sont dues aux mouvements globaux discutés en 3.2.2, des agrégats peuvent disparaître ou apparaître à l'image.

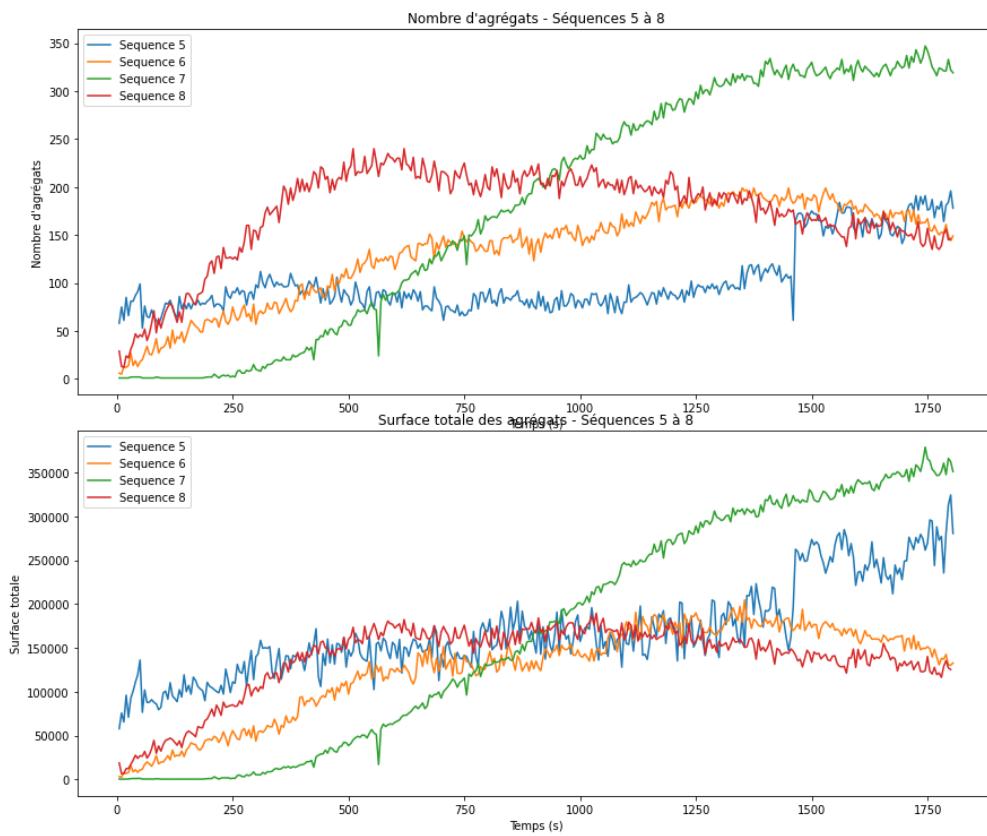
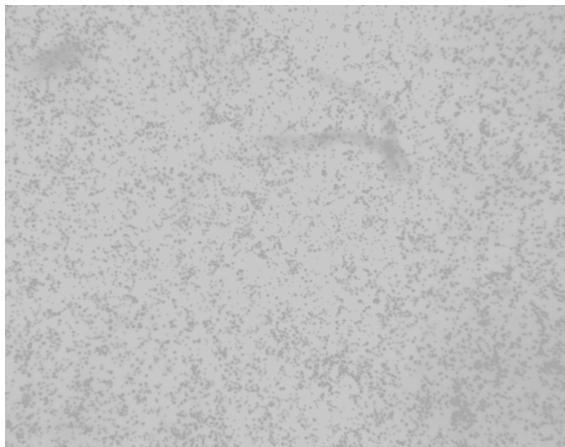
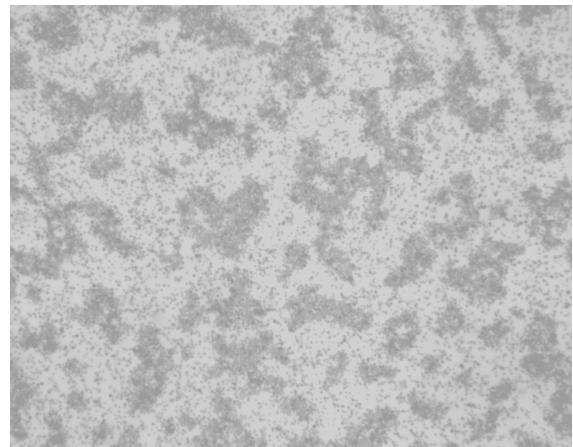


FIGURE 41 – Séquences 5 à 8

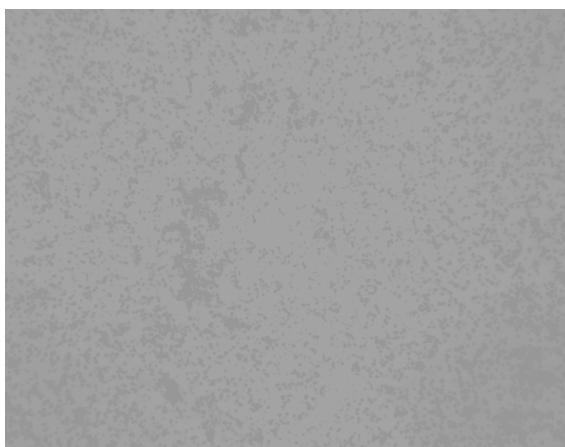
Ci-dessous d'autres comparatifs avec et sans DCMU, l'inhibiteur de la photosynthèse. A chaque fois, l'adsorption est bien meilleure sans DCMU, donc avec activité photosynthétique de l'algue. 2mL d'algues dans du TAP, dans une boîte de Pétri de 3cm de diamètre, pour une acquisition de 30mins. Préexpositions pendant 1h à la lumière dans le photo-incubateur. Dans le TAP, on suppose que l'activité photosynthétique est réduite car les algues peuvent utiliser le milieu comme source d'énergie alternative à la photosynthèse, mais les résultats suffisent à prouver l'effet du DCMU. Voir aussi l'étude en milieu minimal en [3.4.2](#)



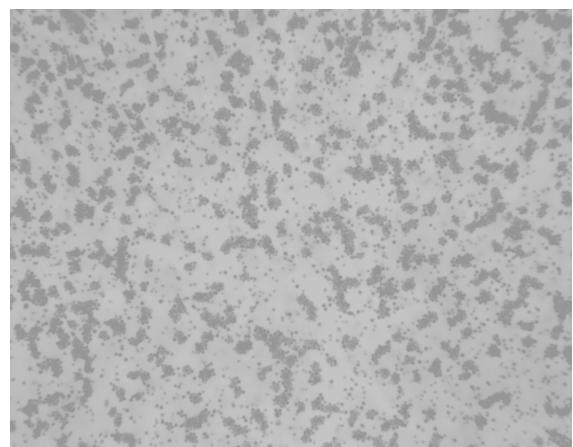
Avec DCMU



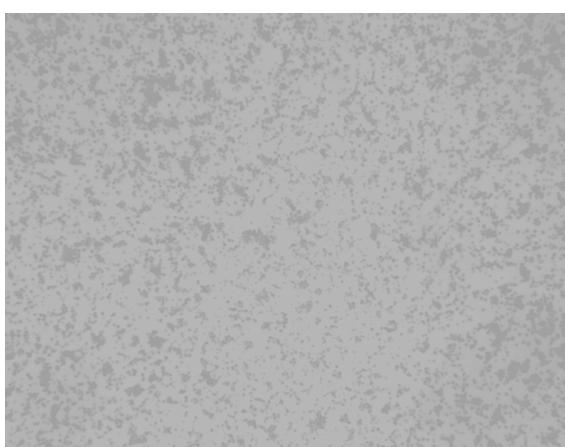
Sans DCMU



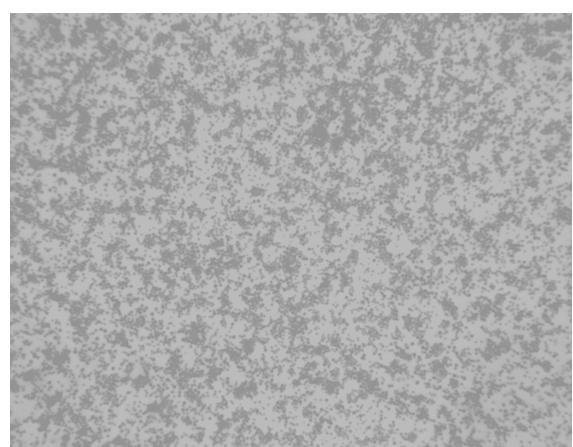
Avec DCMU



Sans DCMU



Avec DCMU



Sans DCMU

FIGURE 42 – Autres comparatifs avec/sans DCMU. Voir section [3.4.1](#)

## Références

### Références

- [1] Raphaël Jeanneret, Matteo Contino, and Marco Polin. A brief introduction to the model microswimmer Chlamydomonas reinhardtii. *The European Physical Journal Special Topics*, 225(11) :2141–2156, November 2016.
- [2] Severin Sasso, Herwig Stibor, Maria Mittag, and Arthur R Grossman. From molecular manipulation of domesticated Chlamydomonas reinhardtii to survival in nature. *eLife*, 7 :e39233, November 2018. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd.
- [3] E. F. Smith and P. A. Lefebvre. PF16 encodes a protein with armadillo repeats and localizes to a single microtubule of the central apparatus in Chlamydomonas flagella. *The Journal of Cell Biology*, 132(3) :359–370, February 1996.
- [4] Melissa Gee and R. Vallee. The role of the dynein stalk in cytoplasmic and flagellar motility. *European Biophysics Journal*, 27(5) :466–473, August 1998.
- [5] Susan K. Dutcher and Eileen T. O'Toole. The basal bodies of Chlamydomonas reinhardtii. *Cilia*, 5(1) :18, June 2016.
- [6] Isabelle Eisenmann. *Phototaxie et phénomènes collectifs chez la micro-algue motile Chlamydomonas reinhardtii*. thesis, Université Paris Cité, December 2023.
- [7] Marco Polin, Idan Tuval, Knut Drescher, J P Gollub, and Raymond E Goldstein. Chlamydomonas Swims with Two “Gears” in a Eukaryotic Version of Run-and-Tumble Locomotion | Science.
- [8] Kirsty Y. Wan and Raymond E. Goldstein. Coordinated beating of algal flagella is mediated by basal coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(20) :E2784–E2793, May 2016. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [9] T. J. Pedley and J. O. Kessler. Hydrodynamic Phenomena in Suspensions of Swimming Microorganisms. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 24(Volume 24, 1992) :313–358, January 1992. Publisher : Annual Reviews.
- [10] Martin A. Bees. Advances in Bioconvection. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 52(Volume 52, 2020) :449–476, January 2020. Publisher : Annual Reviews.
- [11] Knut Drescher, Raymond E. Goldstein, Nicolas Michel, Marco Polin, and Idan Tuval. Direct Measurement of the Flow Field around Swimming Microorganisms. *Physical Review Letters*, 105(16) :168101, October 2010. Publisher : American Physical Society.
- [12] William M. Durham, John O. Kessler, and Roman Stocker. Disruption of Vertical Motility by Shear Triggers Formation of Thin Phytoplankton Layers. *Science*, 323(5917) :1067–1070, February 2009. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [13] Aina Ramamonjy, Julien Dervaux, and Philippe Brunet. Nonlinear Phototaxis and Instabilities in Suspensions of Light-Seeking Algae. *Physical Review Letters*, 128(25) :258101, June 2022. Publisher : American Physical Society.
- [14] Noriko Ueki, Takahiro Ide, Shota Mochiji, Yuki Kobayashi, Ryutaro Tokutsu, Norikazu Ohnishi, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kan Tanaka, Jun Minagawa, Toru Hisabori, Masafumi Hirono, and Ken-ichi Wakabayashi. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19) :5299–5304, May 2016. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [15] Georg Nagel, Doris Ollig, Markus Fuhrmann, Suneel Kateriya, Anna Maria Musti, Ernst Bamberg, and Peter Hegemann. Channelrhodopsin-1 : A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science*, 296(5577) :2395–2398, June 2002. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [16] Le PDMS (Poly-Di-Methyl-Siloxane) et la microfluidique.
- [17] J. H. Vandermeulen, N. D. Davis, and L. Muscatine. The effect of inhibitors of photosynthesis on zooxanthellae in corals and other marine invertebrates. *Marine Biology*, 16(3) :185–191, October 1972.

- [18] Alexandros A. Fragkopoulos, Jérémie Vachier, Johannes Frey, Flora-Maud Le Menn, Marco G. Mazza, Michael Wilczek, David Zwicker, and Oliver Bäumchen. Self-generated oxygen gradients control collective aggregation of photosynthetic microbes. *Journal of The Royal Society Interface*, 18(185) :20210553, December 2021. Publisher : Royal Society.
- [19] M. Sh Ramadan, N. M. El-Mallah, and G. M. Nabil. Thermodynamics and Aggregation Number of Surfactants in Water-Acetonitrile Mixtures. *Asian Journal of Chemistry*, 25(16) :9059–9065, October 2013. Publisher : <https://asianpubs.org/>.
- [20] Diadié Diouf. MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MAÎTRISE EN OCÉANOGRAPHIE. 2009.
- [21] Le silicium, l'élément longtemps oublié des plantes terrestres – Soin de la Terre.