

Protocole et méthode

Introduction

L'objectif de ce projet a consisté à développer une méthode expérimentale simple pour observer un phénomène de bioconvection chez des bactéries aérobies dans une goutte de confinée. En effet, nous avons cherché à mieux comprendre quels étaient les paramètres clés influençant ce phénomène de bioconvection, tels que la taille de la goutte ou le type de souche bactérienne utilisé. Ce rapport détaille les étapes de construction de la cellule d'observation, le protocole d'acquisition des données ainsi que la méthode mise en place pour les exploiter.

Matériel utilisé

- Microscope Dino Lite portable avec grossissement 40x
- Plaque de plexiglas 1 cm d'épaisseur
- Boîte en carton
- Source de lumière blanche (éclairage à l'aide d'un portable)
- Lames de verre 75 mm x 26mm x 1 mm
- Lamelle de microscope 50 mm x 24 mm x 0,2 mm
- Cache en carton de quelques centimètres carrés de surface
- Pipette 200 μ L
- Parafilm
- Scalpel
- Milieu LB liquide
- Agitateur-incubateur
- *Bacillus subtilis* WT
- *Pseudomonas fluorescens* WT
- *Pseudomonas fluorescens* mutant Δ -flagelle
- Spectrophotomètre UV-Visible
- Microscope optique AE 2000 (grossissement x400) avec caméra Basler acA1440

Construction de la cellule d'observation :

La cellule d'observation est construite à partir d'une base en plexiglas de dimension 5 cm x 5 cm x 1 cm découpée à la découpe laser à partir d'une plaque de plexiglas d'épaisseur 1 cm. L'utilisation d'une fraiseuse a ensuite permis d'usiner la base en plexiglas en perçant deux rainures centrées de dimensions 4 mm x 2 mm et espacées de 1 mm d'épaisseur. Avant chaque expérience, les parois verticales de la cellule d'observation (lames de verre) sont fixées en les emboîtant dans les 2 rainures de la base en plexiglas. Pour ce faire, un bout de Parafilm est d'abord découpé et étendu à plat sur toute la surface de la base en plexiglas. Deux empilements de deux lames de 1 mm d'épaisseur sont ensuite intercalées dans chacune des rainures de la base en plexiglas. L'usinage des rainures a permis un emboîtement parfait des deux lames empilées de 1mm, garantissant ainsi la fixation des parois verticales de la cellule d'observation sans utiliser de collage permanent. Le Parafilm étendu sur la base en plexiglas permet de caler d'autant plus les parois verticales tout en empêchant que la goutte déposée dans la cellule d'observation ne fuit dans les rainures. Un scalpel est utilisé pour découper l'excédent de Parafilm après emboîtement des parois verticales dans les rainures, de manière à ne pas gêner l'observation de la goutte. Enfin, un trait est tracé sur l'une des parois verticales à 1 mm de hauteur de la base pour servir d'échelle lors de l'acquisition des données.

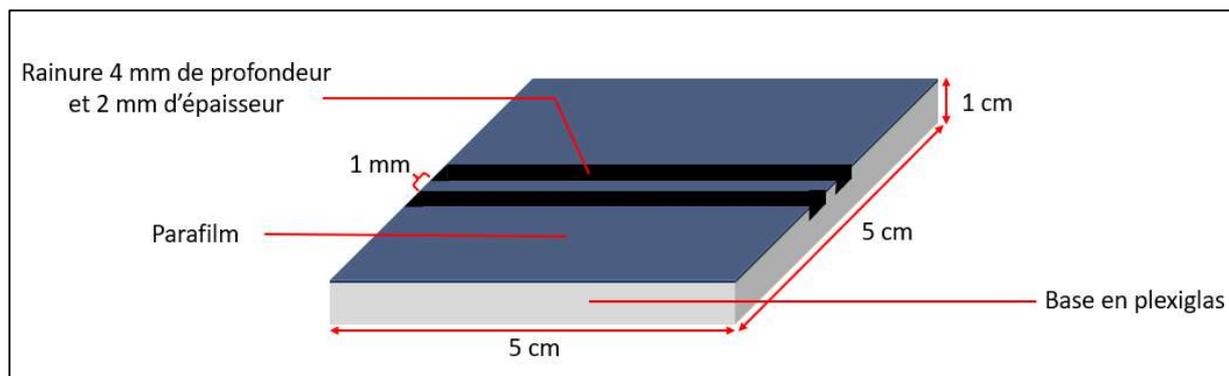


Figure 1 | Schéma de la base de la cellule d'observation ayant été usinée

Montage expérimental

Les cultures bactériennes sont incubées pendant 24h dans quelques mL de milieu LB à 28°C et 180 rpm. La densité optique des cultures diluée au dixième est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Celles-ci sont comprises entre 0,2 et 0,3. On prélève également 20 µL des cultures diluées pour les observer au microscope optique AE 2000 .

Le montage d'observation est ensuite assemblé en branchant le microscope Dino à l'ordinateur et en le fixant sur une potence. La cellule d'observation est placée à environ 7 cm du microscope Dino. Une mise au point est effectuée avec la molette de grossissement du

microscope Dino. La cellule d'observation est ensuite éclairée par l'arrière avec une source de lumière blanche derrière un cache en carton de façon à obtenir un éclairage 'Dark Field' de la goutte, en éliminant les rayons paraxiaux. Le dispositif expérimental est placé dans l'obscurité en le recouvrant d'une boîte en carton suffisamment grande pour contenir l'ensemble des éléments du montage. Un volume de 100 μL de la culture mère pure est injecté délicatement au centre de la cellule d'observation en prenant soin de ne pas introduire des bulles d'air dans la goutte. L'acquisition est lancée à l'aide du logiciel Dino pour un enregistrement d'approximativement 10 minutes.

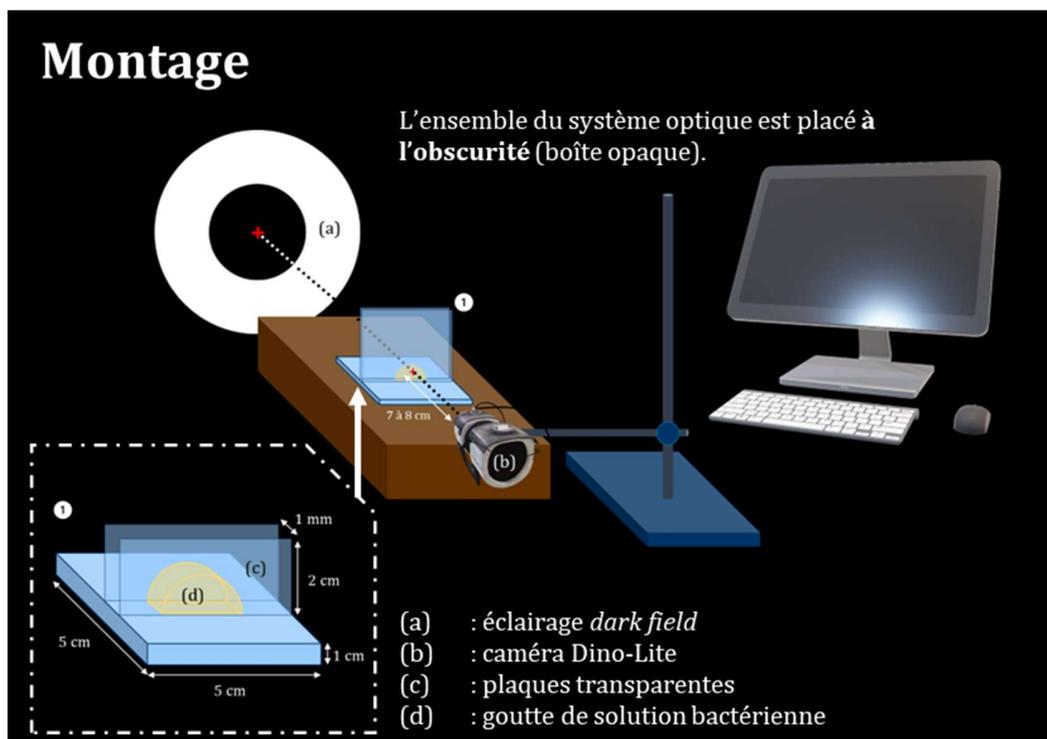


Figure 2 | Schéma du montage expérimental d'observation mis en place

Protocole de traitement des données

Nous avons obtenu pour chaque souche bactérienne testée (*Pseudomonas fluorescens* WT, *Pseudomonas fluorescens* mutant sans flagelle, *Bacillus subtilis* WT) 5 acquisitions exploitables du phénomène de convection avec une turbidité des cultures suffisante ainsi qu'une géométrie de goutte régulière sans aspérités. Pour chaque acquisition nous avons cherché à évaluer les paramètres suivants :

- Temps d'apparition de la zone de déplétion
- Temps d'apparition des cellules de convections
- Epaisseur de la zone de déplétion
- Le nombre de cellules de convection

- Distance moyenne entre les cellules de convections (que nous appellerons par la suite longueur d'onde)
- Dimensions de la goutte

Le temps d'apparition de la zone de déplétion est évalué au premier signe d'inhomogénéité de la turbidité de la goutte, tandis que le temps d'apparition des cellules de convection est donné par la perception de la première déformation du front de déplétion.

L'épaisseur de la zone de déplétion est déterminée lors de la phase où les cellules de convection ne sont pas encore apparues. Il s'agit de la distance maximale du front de déplétion, évaluée par un traitement sur le logiciel ImageJ grâce à l'échelle (trait noir sur la paroi verticale de la cellule d'observation à 1 cm de la base).

Le nombre de cellules de convection est relevé à l'instant où l'on observe un maximum de ces boucles de convection déformant la zone de déplétion. Une capture d'écran est alors effectuée afin de déterminer à l'aide du logiciel Image J la longueur d'onde moyenne entre ces cellules de convection, ainsi que les dimensions de la goutte (hauteur et longueur à la base).

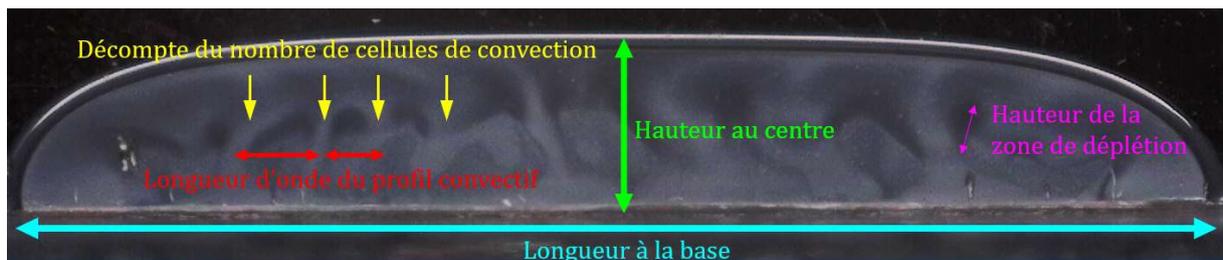


Figure 3 | Schéma explicatif des grandeurs mesurées

Nous avons également effectué pour chaque souche de bactéries une acquisition sous microscope optique AE 2000 avec une caméra Basler acA1440 afin de caractériser leur motilité respective. L'échelle a été déduite des propriétés du microscope et de la caméra (grossissement 40x de l'objectif avec une taille de pixel de la caméra de 3,45 μm x 3,45 μm). Une mesure de la taille des bactéries a pu être effectuée à partir de plusieurs captures d'écran sur ImageJ. Nous avons également obtenu une vitesse moyenne pour chaque souche de bactérie par « manual tracking » sur ImageJ en pointant sur chaque séquence d'image une dizaine de bactéries.

L'ensemble des résultats numériques sont donnés avec un intervalle de confiance à 95% et des tests statistiques (égalité des variance, égalité des moyennes) ont été effectués afin de repérer de potentielles différences significatives entre les différentes bactéries testées.