

Protocole et Méthodes

CHIMIOTACTISME CHEZ LA PARAMÉCIE

1 Culture des paramécies

Les paramécies utilisées sont de l'espèce *Paramecium tetraurelia*. Les bactéries dont elles se nourrissent sont de l'espèce type *Klebsiella pneumoniae*.

Le milieu de culture des paramécies est constitué de WGP (wheat green powder) qui est une infusion à base d'herbes. Pour préparer 1L de milieu de culture, les étapes suivantes sont nécessaires:

- Préparation du tampon phosphate. Dans 50mL, mélanger 0.75g de Trizma Base, 1.5g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et 0.15g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Préparation de l'infusion de WGP. Infuser à chaud 10g de WGP dans 200mL d'eau pendant 15minutes. Filtrer sur papier filtre et coton. Ajuster le volume final à 200mL.
- Mélanger 50mL du tampon phosphate avec 50mL de l'infusion de WGP dans 900mL d'eau.
- Filtrer sur un Büchner de pores 2 μm en conditions stériles.

De sorte à éviter une terrible contamination de toute notre réserve de milieu de culture d'un coup, nous avons divisé notre réserve en plusieurs flacons stériles de 500mL, eux mêmes subdivisés en flacons stériles de 50mL au besoin.

La culture des paramécies est relativement aisée. Notre culture est divisée entre une dizaine de Falcon de 15mL dont le bouchon est simplement déposé sur le dessus (une fermeture hermétique entraînerait l'asphyxiation de nos paramécies !). Ces dernières survivent d'une séance de PSE sur l'autre dans les conditions de la paillasse, cependant, elles doivent être repiquées toutes les semaines. En détail :

- Prélever 1mL d'un Falcon contenant les paramécies et les verser dans un nouveau tube contenant 5mL de milieu de culture.
- Ajouter 1 μL de β -Sitostérol, qui permet un meilleur maintien de la structure et du fonctionnement de la membrane cellulaire des paramécies.
- Si le milieu n'était pas bactérié, bactérier le milieu en prélevant des bactéries d'une boîte de pétri contenant les bactéries *KP* avec un cure-dent stérile.

Ces manipulation doivent évidemment être effectuées en conditions stériles (flamme d'un bec benzène,...).

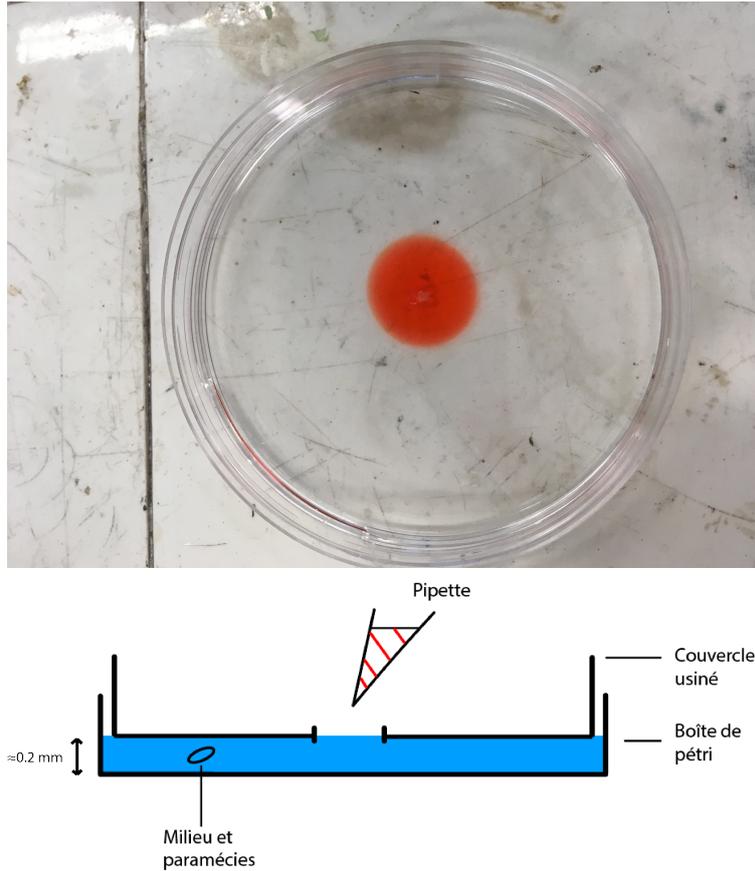


Figure 1: Boîte de pétri usinée.

2 Montage expérimental

Pour observer le chimiotactisme, nous avons usiné et adapté une boîte de pétri classique. La figure 1 illustre le montage expérimental.

L'objectif était de confiner les paramécies dans une épaisseur assez faible de sorte d'interdire la superposition de plusieurs paramécies selon la hauteur (afin de faciliter la tâche au logiciel lors de l'analyse d'image), tout en laissant une hauteur suffisamment importante pour ne pas engendrer une contrainte mécanique parasite qui viendrait fausser nos résultats. Il se trouve que le simple poids du couvercle retourné de la boîte de pétri remplit les deux conditions précédentes. Le trou usiné dans le couvercle permet l'introduction des espèces chimiques dans le milieu.

La nage des paramécies est filmée grâce à une caméra montée sur sa binoculaire. L'acquisition est réalisée avec le logiciel associé *AmScope*. Les paramètres d'acquisition vidéos sont à ajuster selon l'éclairage de la salle de TP (*Contrast* et *Gamma*, mais certains paramètres restent inchangés comme le *Framerate* qui doit être mis au maximum pour éviter des problèmes d'échantillonnage, ou bien le compresseur vidéo, le plus optimal étant le *JPEG Compressor* avec la qualité 75.

Les vidéos sont analysées avec *Fiji* (une version plus complète d'ImageJ). Les étapes suivantes sont réalisées :

- Importer la vidéo (en .avi en) en *Virtual Stack Greyscale*.
- Réduire le nombre de frames avec Image → Stacks → Tools → Reduce → Facteur 2.
- Réduire la taille de l'image avec Image → Transform → Bin → Facteurs XY 2.
- Sauvegarder une image du Background en .png.
- Sauvegarder le film en .tiff.
- Enlever le Background via Process → Image Calculator → Subtract Background en sélectionnant l'image enregistrée précédente.
- Binariser la séquence d'images avec Image → Adjust → Threshold. Les paramètres du threshold doivent être ajustés manuellement, mais l'algorithme *Max Entropy* offre les meilleurs résultats.
- Filtrer le bruit résiduel avec Process → Filters → Kuwahara Filter.

A ce stade, les vidéos peuvent normalement être analysées mais si la qualité n'est toujours pas au rendez-vous les étapes suivantes peuvent être prises :

- Re-binariser l'image avec le processus de threshold.
- Remplir les trous avec Process → Binary → Fill Holes.
- Eliminer drastiquement le bruit avec Process → Binary → Erode. Attention cette étape peut faire disparaître ou "clignoter" certaines paramécies qui auraient été mal détectées.
- Augmenter la taille des paramécies restantes avec Process → Binary → Dilate.

Les trajectoires des paramécies sont calculées avec le programme *TrackMate* présent dans *Fiji*. Les paramètres importants à utiliser sont les suivants :

- LoG Detector : filtre Laplacian of Gaussian qui permet de détecter les objets circulaires sur l'image. Une taille optimale pour le paramètre *blob diameter* est 10 pixels avec un *Threshold* de 0.5 et sans sub-pixel localization.
- Le *threshold* peut être laissé sur auto.
- Le *Simple LAP Tracker* suffit pour suivre la trajectoire des paramécies, ou bien le *LAP Tracker* avec 25 pixels pour le *max linking distance* et le *gap closing max distance* et un *frame gap* de 3.
- Le résultat des trajectoires est exporté en .xml.

La progression entre les divers étapes de l'analyse d'image peut être visualisée en *figure 2*.

Les fichiers .xml sont convertis en fichiers .xlsx puis analysés à l'aide de notre code Python. Le but des algorithmes utilisés est de récupérer les trajectoires des paramécies frame par frame et de calculer leur libre parcours moyen dans de multiples zones autour de l'attractant ou du répulsif. Les zones sont définies telles que les couronnes formées soient de même aire. Le problème à résoudre s'écrit alors $R_{n+2}^2 - 2R_{n+1}^2 + R_n^2 = 0$ et la solution s'écrit :

$$R_n = 461 \sqrt{\frac{n}{N}} \quad (1)$$

où N représente le nombre de subdivisions imposé.

La fonction *lpm* prend en argument le chemin du fichier .xlsx à analyser et renvoie en sortie les rayons des milieux des couronnes tels que les couronnes possèdent toutes une aire constante, ainsi que le libre parcours moyen dans chacun de ces intervalles. On utilise les fonctions *dessin*, *dessin2*, *dessin3* et *dessin4*, en fonction du nombre de subdivisions temporelles de la vidéo, qui tracent le libre parcours moyen en fonction de la distance à la tâche d'attractant ou de répulsif, qui se trouve dans le coin inférieur gauche dans nos vidéos. Ces fonctions prennent en argument le chemin des fichiers .xlsx et utilisent la fonction *lpm*.

3 Chimiotactisme

Pour étudier le chimiotactisme de nos paramécies, nous avons identifié deux attractants ou répulsifs potentiels dans la littérature : AcNa et AcOH. Afin de déterminer leur concentration optimale, nous avons effectué une gamme de concentration pour ces deux produits de 5 mmol/L à 1 mol/L . Les solutions sont préparées directement en salle de PSE. Nous nous sommes ainsi concentrés sur l'étude de AcOH à 5 mmol/L .

Nous avons également cherché à identifier les canaux transmembranaires en action dans le mécanisme étudié. Pour cela, nous avons utilisé différents complexant de la littérature : du TEA pour les canaux potassiques et de l'EGTA pour les canaux calciques via de nouvelles gammes de concentration.

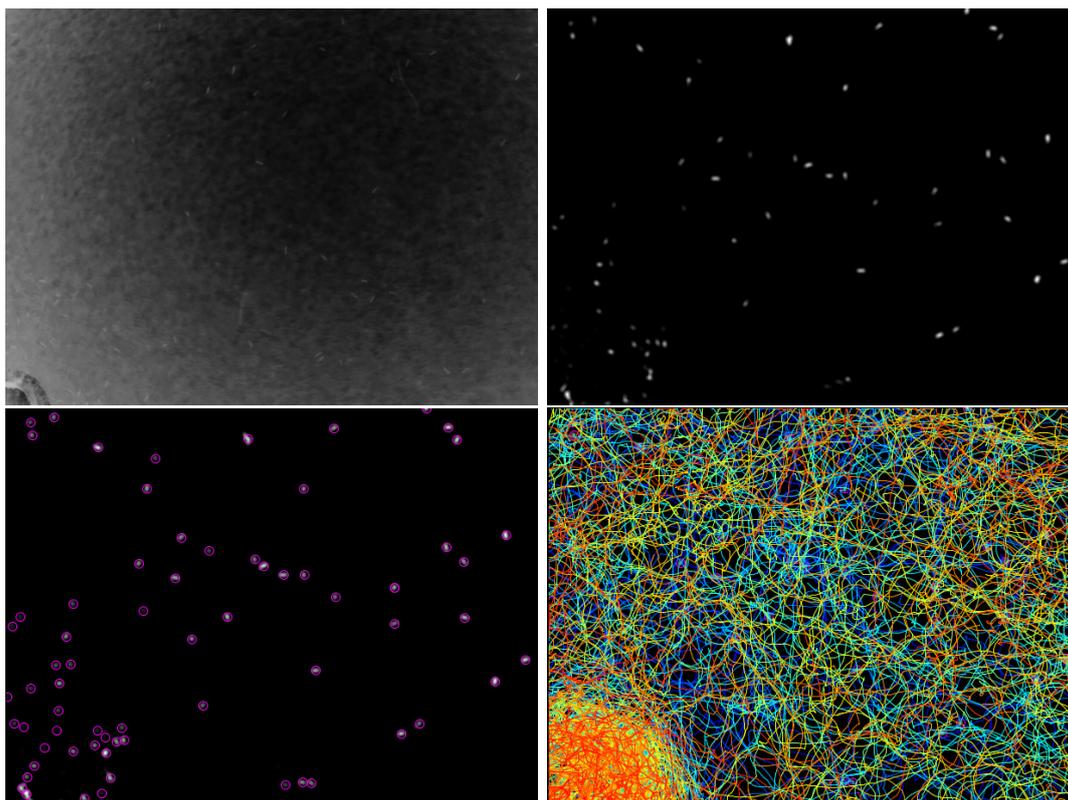


Figure 2: Étapes de l'analyse d'image. L'attractant est situé en bas à gauche de l'image.