MÉTHODES ET PROTOCOLES
PSE 38B Bioluminescence et cycle circadien

Vincent Jacamon, Matthieu Chaniolleau, Agathe Legendre

Protocoles présentés:
-Protocoles pour préserver une culture de Pyrocystis fusiformis
-Protocole pour la mesure de la bioluminescence par photodiodes
-Protocole de l'acquisition des images par la caméra
-Protocole pour préparation des puits
-Protocole pour l'ajout de l'acide dans les puits
-Annexe

Protocoles pour préserver une culture de Pyrocystis fusiformis

Protocole de maintien artificiel du cycle jour/nuit pour Pyrocystis Fusiformis (PF) :
Venant au laboratoire de jour mais devant mener des expériences de nuit sur les dinoflagellés, nous avons inversé artificiellement le cycle circadien de PF.

Matériel :
- boîte en carton d'environ 50cm*50cm*50cm
- peinture noire
- scotch occultant
- 10cm*10cm de tissu noir occultant
- ampoule fluocompacte couleur "daylight" (6500K), d'intensité 1000 lumen
- douille type E27 + cordon avec interrupteur pour l'ampoule
- prise programmable électronique

Protocole :
Peindre l'intérieur du carton en noir. Faire un trou sur le dessus du carton, y faire passer le cordon pour l'ampoule afin que l'ampoule éclaire l'intérieur de la boîte. Sur un des côtés, découper une fenêtre, la recouvrir de tissu occultant (cela servira à manipuler facilement les PF). Scotcher le carton sur la paillasse avec le scotch occultant, veiller à ne pas laisser de lumière entrer dans la boîte. Définir les heures ON du programmateur sur 20h-8h tous les jours de la semaine, et les heures OFF sur 8h-20h. Brancher le cordon sur cette prise. Placer enfin le milieu avec PF dans cette boîte.

Protocole pour repiquer une culture de Pyrocystis fusiformis :
Protocole à réaliser environ une fois toutes les trois semaines.

Matériel :
- Souche de Pyrocystis fusiformis : http://zoelux.fr/pyrocystis_fusiformis.html
- Milieu de culture pour plancton bioluminescent : http://zoelux.fr/accessoires.html, à conserver entre 0 et +6°C
- Flasques de culture cellulaires de 100mL
- Pipettes stériles de 20mL
- Pipeteur électronique

- Hotte stérile

Protocole :

Sortir le milieu marin du réfrigérateur et le laisser sous la hotte quelques minutes afin qu'il se réchauffe. Cela permettra de ne pas faire subir de "choc thermique" aux dinoflagellés lors de l'introduction de milieu marin dans la souche de Pyrocystis fusiformis. Déposer la flasque contenant PF sous la hotte en essayant de ne pas l'agiter. Ouvrir la flasque, et à l'aide d'une pipette stérile, retirer le surnageant ne contenant pas de cellules. Repérer grâce à la flasque le volume de milieu restant, que l'on notera V. Avec une nouvelle pipette graduée, prélever un volume de milieu de culture correspondant à 0.9*V, l'introduire dans la flasque de culture. Diviser en deux flasques si nécessaire. Remettre le milieu marin au réfrigérateur, et la culture de PF dans sa boîte de cycle jour/nuit.

Protocole pour déterminer la densité de PF en solution :
Cette étape est à réaliser une fois par semaine afin de vérifier la bonne santé des cultures de PF.

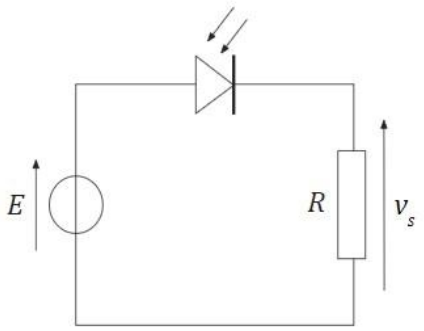
Matériel :
- Flasque contenant des PF
- Microscope
- Micropipette réglable de 10 à 100 μL
- Embouts pour micropipette stériles
- Bec benzène
- Briquet
- Plaque à 3 puits sphériques pour microscope
- Caméra à microscope
- Ordinateur

Protocole :
Secouer doucement la flasque pour homogénéiser la densité en PF dans toute la flasque. Prélever de manière stérile (voir plus bas) 10, 20, 30 μLet les déposer dans les 3 puits de la plaque à microscope. Prendre une photographie de chacun des puits sous le microscope, puis compter le nombre de cellules dans l'image.
La densité de cellules en solution s'obtient par la formule suivante : d=$\frac{N}{V}$ avec N le nombre de cellules dans un puits contenant un volume V de milieu.
La densité optimale de cellules est …. . Si d est trop faible, enlever un peu de milieu de culture, si d est trop élevée, repiquer (voir section plus haut).

<u>Protocole pour la mesure de la bioluminescence par photodiodes :</u>
Matériel :
- 6 photodiodes Excelitas VTP1220FBH 5mm 550nm
- 12 résistances de 470kΩ (que l'on montera en série deux à deux)
- code arduino pour la lecture des données envoyées par les photodiodes x s toutes les 2h

Protocole :

Pour pouvoir mesurer l'intensité de luminescence, on fait un montage dit "en polarisation inverse" pour chacune des diodes (une sous chaque puits). On a ici E=5V et R=940kΩ~1MΩ:



L'objectif ici est de synchroniser l'ajout d'acide avec la lecture par la carte arduino des mesures de tension v_s faites par les photodiodes. On mesure ainsi toutes les 2h (écart entre deux ajouts d'acide) les mesures faites par la photodiode correspondante au puits dans lequel on verse l'acide.

Protocole de l'acquisition des images par la caméra :

Matériel :

- caméra
- objectif à focale fixe de 35mm
- logiciel Matlab, avec installation de la boîte à outils "Image Acquisition toolbox"
- logiciel Pylon 6 Camera Software Suite 6.1.1.19832 (Pylon Viewer) : logiciel qui sert à tester les paramètres de la caméra.
- Câble USB / USB 3.0
- Code pour exécuter le programme d'acquisition des vidéos (photos de 3 minutes toutes les deux heures) : test_enregistrement_final.m → voir annexe 2

Protocole pour préparation des puits:

Matériel:

- bec benzène
- briquet
- milieu de culture en phase jour ou nuit selon l'expérience
- micropipette (1000 μL)
- embouts de pipette stérile
- plaque 12 puits

Protocole:

Afin de préparer les 6 puits nécessaires pour effectuer les 6 mesures qui s'étendent sur 12h, on suit le protocole suivant.

Le bec benzène est allumé à l'aide du briquet et la flamme est réglée de manière à être petite (pour ne pas se blesser) mais puissante (pour avoir une forte chaleur et travailler en milieu quasi-stérile) de couleur bleue. Le milieu de culture est sorti de la boîte de conditionnement et on y prélève sous la flamme 1000μL à l'aide de la micropipette et de l'embout stérile gardée dans une boîte qu'il ne faut ouvrir que sous la flamme. On prélève 6 fois 1000μL de manière à remplir les 6 puits. Attention à ce que l'opération ne dure pas plus de 3 minutes, temps au bout duquel le cycle circadien des micro-organismes sera perturbé.

On place ensuite la plaque 12 puits dans la boîte de conditionnement sur le support prévu à cet effet.

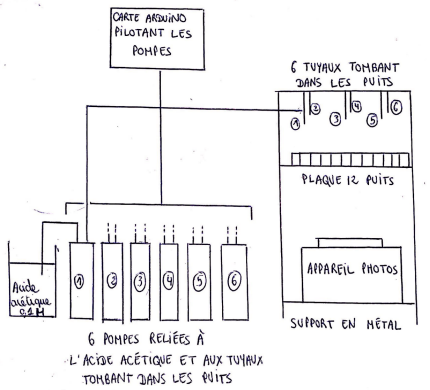
Protocole pour l'ajout de l'acide dans les puits:

Matériel:

- pompes péristaltiques
- tuyau en plastique transparent de 5mm de diamètre
- bécher contenant de l'acide acétique à 0,1M
- support en métal
- plaque 12 puits contenant 6 puits remplis de micro-organismes en solution
- carte arduino
- fils électriques pour le raccordement de la carte arduino et des pompes
- ordinateur
- programme arduino

Protocole:

De manière à ajouter 0,4 mL d'acide acétique toutes les 2h dans un puits différent pour couvrir les 12h d'un cycle circadien, on réalise une programmation à l'aide d'une carte arduino pour automatiser l'opération.



Le support en métal est construit de manière à ce que la plaque 12 puits, surélevée pour laisser la place à l'appareil photo (voir protocole acquisition des images), soit en dessous de 6 tuyaux plastiques reliés aux pompes péristaltiques (voir schéma du montage).

On remplit d'acide acétique le bécher où 6 tuyaux reliés sont reliés aux 6 pompes.

On positionne la plaque 12 puits sur le support de manière à faire coïncider les 6 puits contenant les micro-organismes avec les 6 tuyaux reliés aux pompes.

Une fois l'alignement effectué et bien vérifié à l'aide de l'appareil photo se trouvant en dessous de la plaque, on ferme la boîte de conditionnement et on lance le programme arduino précédemment effectué. Ce programme va 1 fois toutes les 2h pendant 12h, activer une pompe différente pendant un certain temps, de manière à verser 0,4 mL dans les 6 puits contenant les micro-organismes au bout des 12h (voir le programme commenté en annexe).

Annexes

Annexe 1: Codes Arduino et commentaires

1. Initialisation

```
#include <FileIO.h>

void setup() {
pinMode(13, OUTPUT);
digitalWrite(13,HIGH);
pinMode(12, OUTPUT);
digitalWrite(12,HIGH);
pinMode(11, OUTPUT);
digitalWrite(11,HIGH);
pinMode(10, OUTPUT);
digitalWrite(10,HIGH);
pinMode(9, OUTPUT);
digitalWrite(9,HIGH);
pinMode(8, OUTPUT);
digitalWrite(8,HIGH);
```

Il s'agit de l'initialisation du système:

- on attribue une sortie de la carte arduino à chaque pompe: pinMode (13, OUTPUT),
- chaque pompe est initialisée au début du programme comme étant inactive: digitalWrite (13,HIGH).

```
Serial.begin(9600);
  while (!Serial) {
    ;
  }
}
```

Fonction qui va nous permettre de faire apparaître des caractères dans le moniteur série pour savoir dans quelle partie du programme nous sommes après le lancement

2. Exécution

```
void loop() {
t=millis();                    ┐
delay(600000);                 ┘ 1
digitalWrite(13, LOW);         ┐
delay(696);                    │ 2
digitalWrite(13, HIGH);        ┘
Serial.println("1");           ┐ 3
Serial.println("2");           ┘
delay(7199304);                ┐ 4
digitalWrite(12, LOW);         ┘
delay(696);
digitalWrite(12, HIGH);
Serial.println("2");
Serial.println("3");
delay(7199304);
digitalWrite(11, LOW);
delay(696);
digitalWrite(11, HIGH);
Serial.println("3");
Serial.println("4");
delay(7199304);
digitalWrite(10, LOW);
delay(696);
digitalWrite(10, HIGH);
Serial.println("4");
Serial.println("5");
delay(7199304);
digitalWrite(9, LOW);
delay(696);
digitalWrite(9, HIGH);
Serial.println("5");
Serial.println("6");
delay(7199304);
digitalWrite(8, LOW);
delay(696);
digitalWrite(8, HIGH);
Serial.println("6");
Serial.println("Fin");
delay(72000000);
}
```

1 La fonction millis nous permet au début du programme de savoir s'il a bien été lancé. La fonction delay permet de lancer le premier ajout d'acide après un temps que l'on choisit. Ce temps dépend de l'heure à laquelle on lance le programme ainsi que de l'heure à laquelle on veut que le premier ajout ait lieu.

2 On ouvre ensuite la vanne en faisant passer l'état du pin de sortie en LOW avec digitalWrite(13, LOW). On attend 696 ms ce qui correspond au temps qu'il faut pour verser 4mL avant de couper la pompe.

3 On fait apparaître dans le moniteur série les valeurs 1 et 2 pour notifier que le système a fini l'ajout de la première quantité d'acide et n'a pas encore fait la deuxième.

4 On utilise la fonction delay avec comme argument les 2h convertit en millisecondes, auxquelles on soustrait le temps qu'il a fallu pour ajouter les 4 mL d'acide précédemment pour qu'il y ait exactement 2h entre chaque début d'ajout d'acide.

ANNEXE 2 : Code Matlab d'acquisition des images par la caméra

```
%% Configuration du nombre d'images Ã  prendre par acquisition etc
 Nb_periode=6; %nombre d'acquisitions
 Nb_images_par_periode=360; % acquisition pendant 3min
 Nb_images=Nb_periode*Nb_images_par_periode; % nombre d'images qu'on souhaite prendre
 path0 = '.\';
 exposure_time = 500000; % temps d'exposition de la caméra en microsecondes
 gamma = 1;
 gain = 0; %paramètres de la camera
 ROI = [0 0 1440 1080]; % zone de la caméra à enregistrer
 T_video= 0.5; %en s
 freq_video=1/(T_video); %nombre d'images par seconde
 name_subdir=strcat(path0,'videos\');
```

```
%% Configuration des parametres de la camera
nameVid=strcat(name_subdir,'video_','essai');
vid = videoinput('gentl', 1,'BayerRG8'); % selection du mode de la camera
src = getselectedsource(vid);
diskLogger = VideoWriter('C:\Users\PSE\Desktop\PSE LA STREET\Traitement données\enr_test.avi', 'Uncompressed AVI'); %!!
%'C:\Users\PSE\Desktop\PSE LA STREET\Traitement données\enr_20_01_21.avi'
diskLogger.FrameRate=T_video;
vid.DiskLogger = diskLogger;
vid.LoggingMode = 'disk&memory';
vid.DiskLogger = diskLogger;
vid.FramesPerTrigger = Nb_images_par_periode;
vid.TriggerRepeat = Nb_periode;
vid.ROIPosition = ROI;
src.ExposureTime = exposure_time;
src.Gamma = gamma;
```

```
src.Gain = gain;
src.AcquisitionFrameRate = freq_video;
src.AutoFunctionROIOffsetY = 4;
src.ColorAdjustmentHue = 0.25;
src.ColorAdjustmentSelector = 'Yellow';
src.AcquisitionFrameRateEnable = 'True';
triggerconfig(vid, 'manual');
close(diskLogger);
```

```
%% Enregistrement de la vidÃ©o
pause(34440); %pause jusqu'à 20h04'00'', début de la premiere acquisition
disp('start vid');
start(vid); %debut de l'enregistrement
for i=1:Nb_periode
    trigger(vid);
    disp('trigger');
    pause(7020); %1h57 de pause entre chaque sÃ©rie de mesures
end
stop(vid); %arret des acquisitions videos, enregistrement
delete(vid); clear vid
```

Annexe 3 : Code matlab d'exploitation des données

```
figure
for i=1:6
filepath = strcat('C:\Users\PSE\Desktop\PSE LA STREET\Traitement données\essais 14.01\Traitement1_',num2str(i),'.txt');
%récupération des données sous format .txt
D = load (filepath);
D(:,6) = abs(D(:,6) - D(1,6));%enlève l'intensité résiduelle du fond
%(première image traitée censée être d'intensité nulle, car juste avant
%l'ajout d'acide)
D(:,6) = D(:,6)./max(D(:,6));
D(:,1) = D(:,1)./2;
[M,index] = max(D(:,6));
[p,S] = polyfit(D(index:index+4,1),D(index:index+4,6),1);%méthode de la tangente pour obtenir tau
tg = polyval(p,D(:,1),S);
subplot(2,3,i)
hold on
plot(D(:,1),D(:,6),'.',D(:,1),tg)
title(strcat('Data',num2str(i)))
xlabel('Time (s)')
ylabel('Normalized intensity')
ylim([0 1])
legend(strcat('tau = ',num2str(-p(2)/p(1)-index/2),'s'))
end
```