

Méthodes et protocoles

Culture des Pyrostickis Lunula

La culture de Pyrostickis Lunula dans la bouteille de 250mL d'origine a été conservée. À partir de cette culture, nous avons réalisé des cultures de Pyrostickis Lunula dans des fioles de culture de 20mL, en diluant 15 mL de la culture initiale dans 5 mL de milieu de culture (dilution $\frac{3}{4}$), fourni avec la bouteille. Ce sont ces cultures qui ont été utilisées pour nos différentes expériences.

Toutes les deux semaines, nous avons changé 10% de l'eau de toutes les cultures par le milieu de culture.

Les cultures ont été placées dans une boîte dans le noir pour les isoler de la lumière naturelle. Elles ont été maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h/12h contrôlé grâce à un programmateur et une ampoule de 6500 K. Leur nuit commençait à 11h et leur journée à 23h. Nos expériences ont été réalisées entre la 3^{ème} et la 6^{ème} heure de leur nuit, moment où elles sont le plus actives en termes de bioluminescence.

Lien pour la commande des Pyrostickis Lunula et pour le milieu de culture : [Sciento](#)

Lien pour la commande de l'ampoule:

[Ampoule led opaque standard E27 1521 Lm = 12.5 W blanc froid, PHILIPS](#)

Observation des Pyrostickis Lunula

Les cellules ont été observées au microscope optique. D'autre part, les photographies ont été prises à l'aide d'une caméra Basler acA1440-220um connectée au logiciel pylon Viewer.

Lien pour la commande de la caméra:

[Basler ace acA1440-220um - Area Scan Camera](#)

Formation des sphéropastes

Nous avons réalisé une solution de 10 mM de 2,6-Dichlorobenzonitrile (DCB) dans du DMSO. Cette solution se conserve à -20°C puis se décongèle pour une nouvelle utilisation. Nous avons réalisé différentes cultures de 15 mL en y ajoutant 0,25 mL de la solution de DCB. Ces cultures ont été laissées en contact avec le DCB 4 jours, puis centrifugées afin de retirer le milieu de traitement et de le remplacer par le milieu de culture originel. Les expériences en écoulement ont été faites directement après retrait.

Lien pour la commande de DCB, CAS Number 1194-65-6 :

[2,6-Dichlorobenzonitrile 97 % | 1194-65-6](#)

Marquage des cellules

Pour marquer et différencier les sphéroplastes des organismes non modifiés, 50 μL de cellules sont prélevées auxquelles on ajoute 10 μL de solution d'éosine Y aqueuse. Le tout est mélangé. Après 30 minutes de repos, nous effectuons un premier lavage au milieu de culture. Enfin, après encore 30 minutes de repos nous effectuons un dernier lavage. Les cellules peuvent alors être observées au microscope. Les sphéroplastes sont marqués à l'éosine, alors que les autres sont incolores.

Lien pour la commande le solution Y aqueuse :

[Eosin Y solution, aqueous, Pack Size-500ML](#)

Pièce en plexiglas

Nous avons fait réaliser une pièce en plexiglas à l'atelier. Les plaques utilisées sont d'épaisseur 1 mm.

Elle est composée de deux parties : la partie inférieure, qui donne la forme de la zone d'écoulement, et la partie supérieure qui ferme le dispositif et permet l'injection des P. Lunula. Nous avons utilisé de la pâte pour les coller et les isoler. Nous l'avons entourée de deux couches de scotch double face pour améliorer l'isolation.

Nous avons planté à l'entrée et à la sortie des embouts de seringue connectées à des tuyaux en plastique de rayon intérieur 1,5 mm. Les embouts sont collés à la pièce grâce à de la super glue et du scotch double face.



Photographie de la pièce en plexiglas

Expérience de bioluminescence

La pièce en plexiglas est préalablement remplie de milieux de culture. À l'aide d'une seringue et de son aiguille nous prélevons 3 mL de cellules ainsi que 7 mL d'air. Nous injectons ensuite le tout dans la pièce en plexiglas au travers du tuyau en plastique. À la sortie, les P. Lunula sont récoltées dans un bécher. La bioluminescence a été observée grâce à une caméra Basler acA1440-220um placée au-dessus de la pièce au niveau de l'embouchure.

Traitement des images

Le traitement des images a été fait à l'aide d'ImageJ. Nous avons choisi la même zone d'intérêt sur toutes les expériences et nous avons tracé un Z-Axis Profile montrant la moyenne d'intensité de tous les pixels de notre zone d'intérêt sur toutes les images de la séquence. Nous réalisons ensuite la moyenne sur une même série d'expériences (sur les organismes 'wild type' ou ceux traités par le DCB) et nous traçons le graphe de l'intensité en fonction du temps grâce au nombre d'images par seconde prises par la caméra sur Matlab. Nous intégrons enfin les deux courbes obtenues pour comparer l'intensité totale obtenue durant les expériences grâce à la méthode des trapèzes toujours sur Matlab.