

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Michaël Garcia

Thèse dirigée par **Philippe Peyla**

et codirigée par **Salima Rafai**

préparée au sein **du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique**
et de **l'École Doctorale de Physique de Grenoble**

Hydrodynamique de micro-nageurs

Thèse soutenue publiquement le **9 Juillet 2013**,
devant le jury composé de :

M Mohamed Benlahsen

Professeur, Université de Picardie Jules Vernes, LPMC, Président

Mme Anke Lindner

Maître de conférences, ESPCI, LPMMH, Rapporteur

M Christophe Ybert

Chargé de recherche, CNRS, iLM, Rapporteur

Mme Irina Mihalcescu

Professeur, Université Joseph Fourier, LIPhy, Examinatrice

M Florian Delrue

Ingénieur CEA, CEA Cadarache, Examineur

M Philippe Peyla

Professeur, Université Joseph Fourier, LIPhy, Directeur de thèse

Mme Salima Rafai

Chargée de recherche, CNRS, LIPhy, Co-Directeur de thèse



Hydrodynamique de micro-nageurs

Michaël Garcia

Thèse

Grenoble, 9 Juillet 2013

Thèse supervisée par Philippe Peyla & Salima Rafai
Préparée au Laboratoire interdisciplinaire de Physique
Université Joseph Fourier & CNRS
Grenoble, France

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mon épouse pour m'avoir soutenu, encouragé, supporté (dans les deux sens du terme) pendant ces années de thèse et sans qui ce manuscrit ne serait peut être pas sous vos yeux aujourd'hui. Je remercie également ma fille Sarah pour sa bonne humeur très matinale et ses « mon papa ! » irrésistibles.

Je remercie mes directeurs de thèse Salima et Philippe pour m'avoir fait découvrir le monde de l'hydrodynamique des fluides complexes et des suspensions actives et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse. Merci à Salima pour sa rigueur scientifique et expérimentale, ses idées de manip et pour la liberté qu'elle m'a laissé dans la direction des travaux de ma thèse. Merci à Philippe pour son ouverture d'esprit et ses réflexions avisées lors de nos discussions. Merci également à eux de m'avoir donné la possibilité de présenter mes travaux en Allemagne ainsi qu'en Inde au cours d'une conférence ouverte en principe aux seuls chercheurs permanents. Enfin, merci pour votre patience pendant la phase de rédaction du manuscrit.

Je remercie le Professeur Mohamed Benhlasen, le Professeur Irina Mihalcescu, le Dr Anke Lindner, le Dr Christophe Ybert et le Dr Florian Delrue d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci en particulier au Dr Lindner et au Dr Ybert d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse.

Je remercie mes parents, mon frère Ludo et mes sœurs Isa, Béné et Laure pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma thèse. Merci à toi Isa pour ta patience à relire mon manuscrit, tu as su débusquer tous les « flagelles » féminins bien cachés dans mon manuscrit et désormais j'arrive (presque) à utiliser ce nom correctement. Pour leur soutien et leurs encouragements, merci à Chewbakkk, à Michaël, à l'*El Zedec Crew* et à ses membres : Benj, Berbo, DJFanf, Jyieng, Lolo, Nico, Sti, Sylvaing et Titou des bois, à la *team des profs* : Amél, Al, Béa, Nico, Sam et Virg, à mes beaux parents Michel et Francine, à Cécile et Maxime, à Émilie et Julien, Pour leur bonne humeur, merci à mes deux co-bureaux de thèse Valentina et Levan. Pour la bonne ambiance et les bons moments passés au LIPhy, merci à David, Vincent, Aparna, Najim, Giovanni, Olivier, Quang, Antoine, Pierre-Yves, Xavier, Luca, Mathias, Othman, Sofia, Alexandre, Elian, Xabel, Guntars, Darja, Purvi, Edith, Theodora, Rachel, Kalpana, Meike, Janek et Jonathan.

Merci à Delphine Débarre, Lionel Bureau, Gwennou Coupier, Thomas Podgorsky, Claude Verdier, Valérie Laurent, Michaël Betton et Clément Nizak pour leur aide en diverses circonstances expérimentales. Merci à Jessie pour son soutien et son aide tout au long de mon passage au LIPhy. Enfin, merci à Irène pour avoir été ma tutrice, pour son écoute et ses conseils.

Je remercie la région Rhône-Alpes pour avoir financé mes travaux de recherche au travers du programme CIBLE.

Avant de poursuivre, je vous demande une seconde de silence (ou trente battements de flagelles) pour les milliards de *Chlamydomonas Reinhardtii* mortes pour la science.

Table des matières

I	Contexte de l'étude	5
1	Suspensions actives et micronageurs	5
2	Phénomènes particuliers dans ces suspensions	7
2.1	Brassage accru du fluide porteur par les micro-nageurs	7
2.2	Phénomènes collectifs : jets et tourbillons	7
2.3	Bioconvection	8
2.4	Modification des propriétés rhéologiques du fluide effectif	11
3	Modélisation de ces phénomènes	13
II	Matériels et méthodes	19
1	Le micro-nageur <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	20
1.1	<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> , un micro-nageur modèle	20
1.1.1	Structure de cette micro-algue	20
1.1.2	Motilité	21
1.1.3	Sensibilité à des stimulus extérieurs : tactismes	22
1.1.4	Autres propriétés	22
1.2	Cultures biologiques de micro-algues	23
1.2.1	Synchronisation des cultures de micro-algues	23
2	Préparation des suspensions de micro-algues pour l'observation en microscopie	27
2.1	Récolte de la culture de micro-algues	27
2.2	Mesure de la fraction volumique d'une suspension de micro- algues	27
2.3	Préparation de la cellule d'observation	28
3	Observation de micro-nageurs en microscopie	29
4	Reconstruction des trajectoires des micro-nageurs à partir de films	29
4.1	Travail des images	30
4.2	Détection des particules	30
4.3	Connexion des positions successives en trajectoires	37
4.4	Filtrage des particules immobiles	38
4.5	Analyse 2D d'un système 3D	38
	Annexes	43
A	Composition et préparation du milieu de culture TAP	43
B	Préparation des boîtes de culture sur milieu solide	44

TABLE DES MATIÈRES

C	Calendrier de repiquage des cultures	44
D	Caractéristiques des caméras utilisées nécessaires à l'analyse des données	45
III Dynamique de nage individuelle en suspension diluée		47
1	Mécanisme de nage des <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	49
1.1	Stratégie de nage à faibles nombres de Reynolds	49
1.2	Mesure de la fréquence moyenne de battement des flagelles des micro-algues	50
1.2.1	Mesure de l'angle de persistance	50
1.2.2	Distribution des angles de persistance	52
1.2.3	Fonction d'autocorrélation de direction	53
1.3	Mesure du module de vitesse moyenné sur un zigzag	55
2	Dynamique de nage aux temps longs devant la durée d'un battement	57
2.1	Mécanisme de nage et marche aléatoire avec persistance	57
2.2	Mesure du temps de rotation hélicoïdale et du temps de ré- orientation aléatoire des micro-algues	59
2.2.1	Distribution des angles de persistance	61
2.2.2	Fonction d'autocorrélation de direction	61
2.2.3	Particularité de la dynamique : mouvement hélicoïdal	62
2.3	Mesure de la vitesse balistique	67
3	Modification de la dynamique de nage suivant la viscosité du fluide porteur	69
3.1	Effet de la viscosité sur le mécanisme de locomotion des micro- algues	69
3.1.1	Fréquence de battement des flagelles en fonction de la viscosité	69
3.1.2	Diminution de la vitesse moyenne sur un zigzag avec la viscosité du milieu	71
3.1.3	Estimation de la friction effective des flagelles	73
3.2	Effet de la viscosité sur la marche aléatoire	77
3.2.1	Dépendance du temps balistique et du temps de ro- tation hélicoïdale à la viscosité	77
3.2.2	Modification de la vitesse balistique	79
4	En résumé	81
IV Effets collectifs en suspension semi-diluée		83
1	Motivation	84
2	Dispositif expérimental	84
2.1	Préparation des échantillons	84
2.2	Microscopie en champ clair d'une suspension dense de micro- nageurs	85
2.3	Microscopie en épifluorescence	86
2.4	Choix du grossissement de l'objectif pour maximiser la préci- sion de la statistique	92
2.5	Reconstruction de trajectoires	93

TABLE DES MATIÈRES

2.6	Gamme d'étude de la fraction volumique	95
2.6.1	Fraction volumique et distance moyenne inter-nageurs	95
2.6.2	Évolution temporelle de la fraction volumique sous éclairage important	96
2.6.3	Méthode de comptage	96
3	Dynamique de nage des <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> en suspension semi-diluée	98
3.1	Dynamique d'orientation des micro-algues <i>Chlamydomonas Rein-</i> <i>hardtii</i>	98
3.2	Mesure des vitesses	101
3.2.1	Vitesse balistique	101
3.2.2	Distributions de module de vitesse	102
3.3	Longueurs de persistance et distance moyenne inter-nageurs .	105
4	Discussion	107
4.1	Distance moyenne inter-nageurs à la transition entre les deux régimes de comportement des temps de corrélation de direction	107
4.2	Identification des temps de corrélation obtenus en fonction de la fraction volumique dans le régime dilué	107
4.3	Comparaison des temps de corrélation en régime dilué avec ceux mesurés au chapitre précédent	108
4.4	Identification des temps de corrélation en régime semi-dilué . .	109
4.5	Évolution des temps et longueurs de corrélation avec la dis- tance moyenne inter-nageurs	109
4.6	Étude de la vitesse en régime semi-dilué	114
5	Résumé et perspectives	115
	Annexes	117
V	Conclusion & perspectives	121
1	En résumé	121
2	Perspectives	123

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre I

Contexte de l'étude

Sommaire

1	Suspensions actives et micronageurs	5
2	Phénomènes particuliers dans ces suspensions	7
2.1	Brassage accru du fluide porteur par les micro-nageurs . .	7
2.2	Phénomènes collectifs : jets et tourbillons	7
2.3	Bioconvection	8
2.4	Modification des propriétés rhéologiques du fluide effectif .	11
3	Modélisation de ces phénomènes	13

L'étude réalisée pendant ma thèse se situe dans le domaine de la mécanique des fluides complexes et plus particulièrement des suspensions actives. On dit d'un fluide qu'il est complexe lorsque son comportement diffère de celui d'un fluide simple (par exemple de l'eau).

Parmi les fluides complexes, les suspensions sont des fluides présents un peu partout autour de nous. Depuis le domaine de l'agroalimentaire (sauces, pâtes, etc.), des cosmétiques (dentifrices, crèmes, mousses à raser, etc.), de la santé (fluides corporels, pommades, etc.), de l'industrie (pneus, béton, etc.) jusque dans la nature et les êtres vivants (boue, suspensions de plancton, de micro-algues, de bactéries, fluides biologiques, etc.), les fluides complexes sont omniprésents.

1 Suspensions actives et micronageurs

Une suspension est dite « active » lorsqu'elle contient des objets microscopiques ayant la capacité de se déplacer par eux-mêmes dans le fluide qui les entoure. Il existe diverses sortes de micro-objets de ce type. Dans le domaine biologique, on peut citer parmi les cellules procaryotes les bactéries *Escherichia Coli* et *Bacillus Subtilis*, parmi les cellules eucaryotes le Trypanosome africain (parasite transmis par la mouche tsé-tsé et responsable de la maladie du sommeil chez l'homme), les spermatozoïdes et les micro-algues (figure 1).

Il existe également des micro-nageurs artificiels. Par exemple, il est possible de concevoir un micro-nageur en recouvrant de platine la moitié de la surface d'un colloïde de

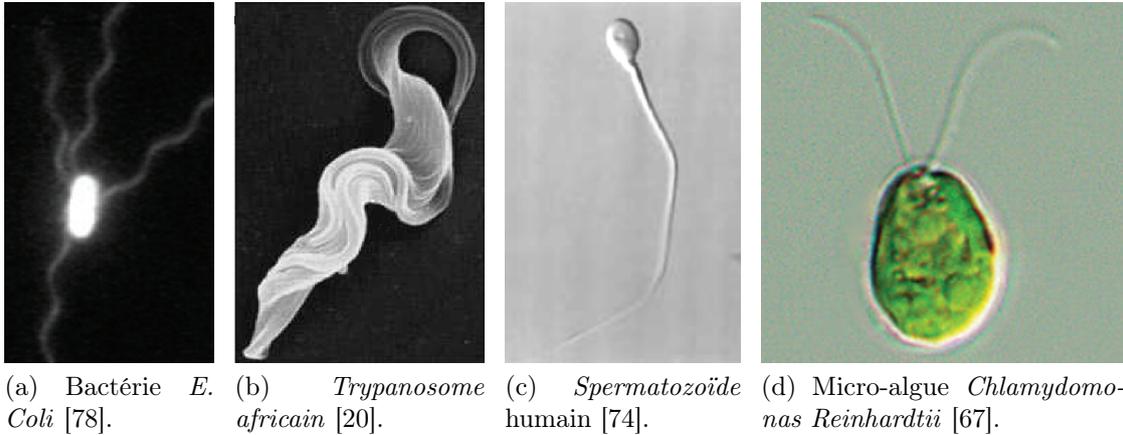


FIGURE 1. Quelques micro-nageurs biologiques et leur stratégie de locomotion. (1a) Nage en faisant tourner ses flagelles en tire-bouchon rigides qui s'entortillent en un paquet de filaments synchronisés. (1b) Nage en propageant une onde de flexion de l'avant vers l'arrière de son corps. (1c) Nage en propageant une onde de flexion de la base à l'extrémité de sa queue. (1d) Nage la brasse avec ses deux flagelles.

latex, puis en le plaçant dans du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). La particule bi-face (nommée particule « Janus ») réalise à sa surface du côté platine une catalyse de la réaction d'oxydation et de réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et di-oxygène [47, 31]. La formation de ces gaz sur une seule des deux faces provoque le déplacement de la particule dans le milieu. Le moteur des micro-objets est l'énergie chimique du peroxyde d'hydrogène. Ce type de micro-nageur permet de réaliser un système expérimental simple, permettant d'étudier les suspensions actives.

Les micronageurs artificiels sont très intéressants également du point de vue du domaine médical. Dans le film « Le voyage fantastique » (1966), il était question d'injecter dans le corps d'un patient, des humains miniaturisés à bord d'un vaisseau pour opérer par l'intérieur un caillot de sang dans le cerveau du malade. Actuellement, il est envisagé de soigner certaines pathologies en injectant de micro-objets dans le corps de patients puis en pilotant ces robots depuis l'extérieur. Ce type de micro-nageur servirait à aller relâcher un médicament à un endroit précis dans le corps du patient ou bien à aller opérer certaines zones difficiles d'accès par chirurgie classique. Le domaine du soin par l'utilisation de micro-robots est en fort développement [46]. Divers procédés sont envisagés pour le contrôle des micro-robots. Par exemple, une équipe a modifié l'interface d'un IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) en milieu hospitalier et est parvenue à piloter avec précision un micro-aimant à l'intérieur d'un être vivant [17]. Des chercheurs ont également conçu des robots artificiels couplés à des organismes biologiques, en collant des bactéries sur de micro-billes de latex pour les faire se déplacer [84, 40, 4]. Cette « hybridation » permet d'éviter le problème de l'embarquement à bord du micro-robot d'une source d'énergie qui puisse être nocive au patient. Il est possible de contrôler la nage des objets à l'aide de molécules (ions cuivres par exemple) dans le milieu. Ces ions viennent

2. PHÉNOMÈNES PARTICULIERS DANS CES SUSPENSIONS

bloquer le mécanisme biologique d'activation des flagelles. Cet état étant réversible, les bactéries peuvent se remettre à nager lorsque le milieu a évacué ces ions. Ce type de soin pourrait être opérationnel d'ici une dizaine d'années.

2 Phénomènes particuliers dans ces suspensions

Les suspensions actives présentent des caractéristiques supplémentaires par rapport à des suspensions classiques telles que le mélange sable et eau par exemple. Le fait que les particules injectent de l'énergie en permanence dans le fluide qui les porte, fait de ces suspensions des systèmes hors équilibre par excellence. Le domaine des suspensions actives est un domaine récent (les premières théories datent de moins d'une cinquantaine d'années). Depuis une trentaine d'années, les propriétés de ces suspensions ont commencé à être étudiées expérimentalement. Des phénomènes très intéressants du point de vue de l'hydrodynamique et de la physique statistique ont pu être observés.

2.1 Brassage accru du fluide porteur par les micro-nageurs

Wu et Libchaber [83] ont étudié des suspensions de bactéries *Escherichia Coli* (dimensions du corps : 4 – 5 μm de long et environ 1 μm de diamètre) dans un film mince d'épaisseur de l'ordre du micron (configuration quasi bidimensionnelle (2D)). Ils ont placé dans ces suspensions des billes de latex fluorescentes de 4,5 à 10 μm de diamètre en faible quantité, dont ils ont étudié la dynamique suivant leur taille. Ils ont observé que le coefficient de diffusion des billes dans la suspension était augmenté d'un facteur 100 par rapport à la valeur de ce coefficient dans un milieu où les billes auraient été sujettes à la seule agitation thermique. La nage des bactéries entraîne un brassage permanent du fluide dans la suspension qui favorise la diffusion des nutriments et de l'oxygène dissous dans la suspension.

2.2 Phénomènes collectifs : jets et tourbillons

Wu et Libchaber [83] ont observé en parallèle que les bactéries semblaient se déplacer de manière collective sous la forme de structures qui naissaient et se défaisaient sans cesse. Ils ont vu se développer des mouvements où des groupes de quelques dizaines de bactéries se déplaçaient ensemble dans la même direction pendant quelques instants (« jets »), entraînant ainsi le fluide avec elles et augmentant significativement leur vitesse individuelle. Ils ont observé également des structures de groupe de type « tourbillon » qui apparaissaient puis disparaissaient dans cette suspension. Ils ont suggéré dans leur étude que ces phénomènes d'organisation collective étaient responsables de la forte augmentation de la diffusivité des particules inertes placées dans le fluide. Le mécanisme responsable de la création des formes observées n'a pas été élucidé dans leur article. Ils ont proposé que ce phénomène soit dû aux interactions hydrodynamiques et/ou stériques entre bactéries.

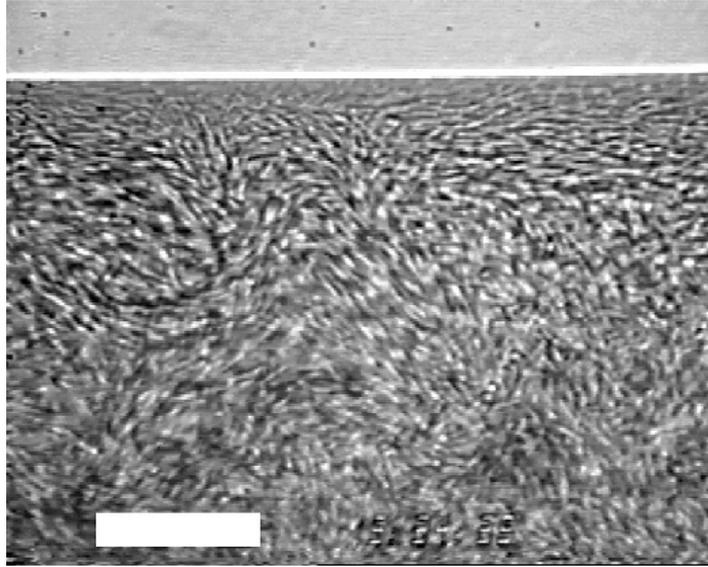


FIGURE 2. Mouvements collectifs visibles dans la partie concentrée d'une goutte de suspensions de bactéries *Bacillus Subtilis*. On observe des « motifs » de taille supérieure à celle d'un micro-organisme sur la photo. La goutte est posée sur une boîte de Petri et observée par en dessous. La ligne blanche en haut de la figure est la ligne triple air-fluide-substrat. La barre d'échelle blanche mesure $35\ \mu\text{m}$ de long. Image extraite de [14].

Ces phénomènes collectifs ont également été observés en configuration tridimensionnelle (3D) par Dombrowski et al. [14] avec la bactérie *Bacillus Subtilis* dans des gouttes déposées à la surface d'une boîte de Petri. Dans leur étude, ils ont observé que les cellules allaient s'accumuler sur le bord de la goutte et que dans cette zone très concentrée, on pouvait observer des mouvements collectifs avec formation intermittente de jets et de tourbillons (figure 2). L'origine de ces mouvements collectifs a été l'objet de nombreuses études théoriques et numériques ces dernières années [41].

2.3 Bioconvection

Parmi les phénomènes particuliers que l'on peut observer dans ces systèmes, il est celui de la bioconvection [14, 49, 29]. L'objet de l'étude menée par Dombrowski et al. dans leur article de 2004 était la bioconvection dans une configuration particulière. Ce phénomène peut survenir si les micro-organismes nagent en moyenne vers le haut et sont plus denses que l'eau. Parmi les micro-nageurs biologiques, un grand nombre nage vers le haut pour des raisons diverses et variées (aérotactisme chez les bactéries et gravitactisme et/ou asymétrie entre l'avant et l'arrière du corps pour les *Chlamydomonas Reinhardtii* [38, 57]).

La bioconvection se manifeste de la manière suivante (figure 3) dans le cas de bactéries aérotactiques (pour des algues nageant vers le haut, le principe est similaire). Les bactéries nagent vers le haut en moyenne vers l'interface fluide-air, zone la plus concentrée en oxygène. Peu à peu, elles s'accumulent vers la surface et com-

2. PHÉNOMÈNES PARTICULIERS DANS CES SUSPENSIONS

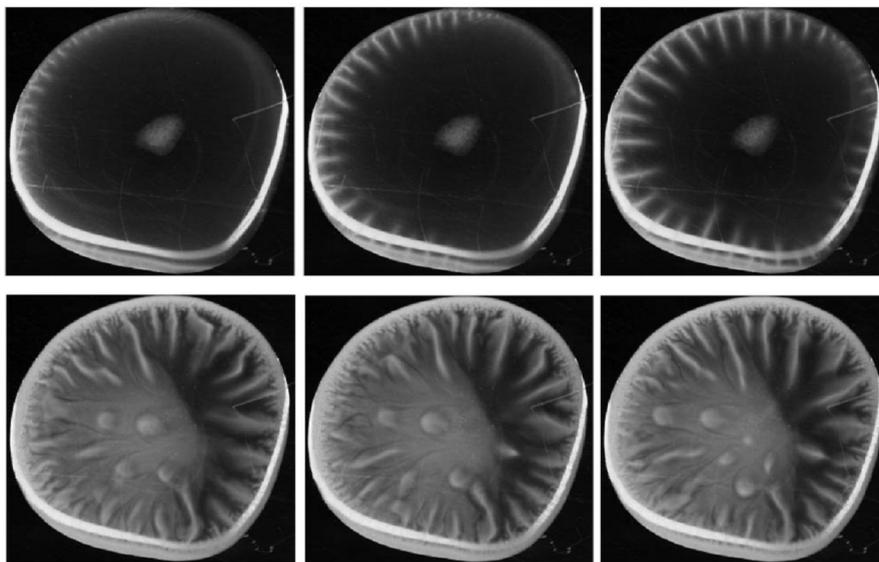


FIGURE 3. Bioconvection dans une goutte d'un centimètre de diamètre de suspension de *Bacillus Subtilis* déposée horizontalement sur une boîte de Petri. *En haut* : On observe des ondes de déplacement qui se forment au bord de la goutte au départ puis s'étendent vers le centre de la goutte (images prises à intervalle de 5 minutes). *En bas* : On observe les colonnes de bactéries en vue de dessus qui se forment puis se déplacent vers le bord de la goutte (images prises à intervalle de 2 minutes). Images extraites de [14].

CHAPITRE I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

mentent à former une couche concentrée. Cette accumulation de cellules plus denses que le fluide situé en dessous d'elles crée une instabilité et des portions de la couche supérieure de bactéries se détachent de la surface pour retomber dans le fluide situé en dessous, formant des « colonnes descendantes » (« plumes » en anglais) de suspensions concentrées de bactéries [13]. Il se forme une couche concentrée de cellules peu mobiles au fond de la suspension à cause de la raréfaction de l'oxygène dissous dans le fluide, provoquée par la respiration des cellules. Les bactéries qui retombent emportent avec elles du fluide provenant de la surface, fluide qui contient plus d'oxygène qu'au fond de la goutte. Cet apport d'oxygène dissous permet à une partie de la couche immobile du fond de consommer à nouveau de l'oxygène et de se remettre à nager. Ces bactéries remontent vers la surface et l'on assiste à un cycle continu de remontée et retombée des bactéries sous forme de « colonnes ».

Dans le cas de l'expérience de Dombrowski et al. de 2004, le fait que la géométrie soit une goutte au lieu d'un volume avec une interface plane air-fluide rend la dynamique de bioconvection plus complexe. En plus des mouvements de descentes et de retombées des bactéries dus à la combinaison d'aérotactisme et d'instabilité de densité, la forme courbée du ménisque vient modifier la manière dont l'instabilité créée proche du ménisque évolue. Le fait que le ménisque soit incliné entraîne une retombée de la couche supérieure des bactéries vers les bords de la goutte d'une manière ressemblant à celle de l'effet Boycott dans la sédimentation de particules. Dans l'effet Boycott [1], un tube contenant une suspension de particules inertes qui sédimentent est incliné par rapport à la verticale (figure 4). Cela fait que la couche de fluide en contact avec la paroi du tube la plus haute se retrouve appauvrie en particules plus denses que l'eau, lesquelles sédimentent horizontalement. Cette couche de fluide moins dense que la couche en dessous d'elle a tendance à se hisser vers le haut du tube pour passer complètement au dessus de la couche la plus dense. Cela crée un courant ascendant le long du haut du tube, qui génère par conséquent un courant descendant sur la paroi la plus basse du tube, ce qui accélère la sédimentation des particules. Dans le cas de Dombrowski et al., le fluide est plus dense en haut qu'en bas, ce qui génère un glissement de la couche la plus dense vers le bas de la goutte et forme un tourbillon dans la zone de la ligne de triple [79]. Au sommet de la goutte, la couche dense laisse échapper des « paquets » de bactéries à la manière de la bioconvection avec une interface horizontale [50], qui redescendent vers le fond de la goutte, tout en se déplaçant vers l'extrémité de la goutte sous l'effet de la gravitation et de l'inclinaison du ménisque.

Le type de mécanisme responsable de la nage vers le haut des micro-organismes influence fortement la dynamique observée dans la bioconvection et l'on peut même distinguer différentes formes de bioconvection [12]. Le phénomène de bioconvection peut jouer dans certaines conditions un rôle dans le brassage des océans pour la circulation des nutriments présents dans les fond marins vers la surface [72, 37]. Ce phénomène est également important dans la formation de bio-films lors de la colonisation de surfaces par des micro-organismes. Il permet un brassage des nutriments et de l'oxygène dans la suspension permettant ainsi de nourrir toute la colonie et pas seulement la portion proche des bords de la suspension. Le méca-

2. PHÉNOMÈNES PARTICULIERS DANS CES SUSPENSIONS

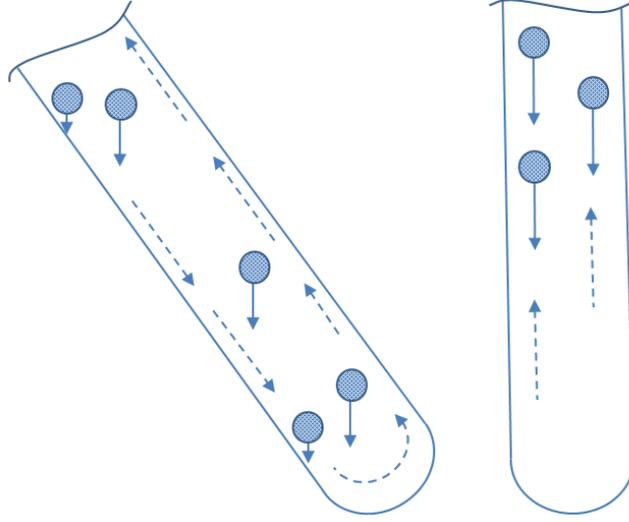


FIGURE 4. Illustration de l'effet Boycott. La sédimentation de particules en suspension dans un fluide dans un tube est plus rapide lorsque le tube est incliné par rapport à la verticale. Dans le tube de droite, la descente des particules suivant l'axe vertical est freinée par la remontée du fluide suivant le même axe en moyenne. Dans le tube incliné, la symétrie est brisée. Les particules sédimentent toujours verticalement mais le fluide remonte en moyenne suivant la direction d'inclinaison du tube. Les particules en sédimentant laissent derrière elles une zone contenant seulement du fluide. Cette zone « libre » permet au fluide de remonter plus facilement vers le sommet du tube. Il se crée un courant ascendant dans cette zone. Ce courant en génère un autre, situé dans la zone vers laquelle les particules sédimentent. Ce courant dirigé vers le fond du tube entraîne les particules qui sédimentent, accélérant ainsi le phénomène de sédimentation.

nisme de bioconvection semble aujourd'hui bien compris [29]. Il reste à expliciter les mécanismes responsables des mouvements collectifs observés aux échelles de l'ordre de quelques micro-organismes que nous avons décrits au paragraphe précédent. Ces phénomènes se déroulant à des échelles de taille et de temps bien plus faibles que celles de la bioconvection, il est fort probable que les causes des deux phénomènes soient différentes.

2.4 Modification des propriétés rhéologiques du fluide effectif

On notera une dernière conséquence macroscopique de l'activité des constituants élémentaires d'une suspension active, celle de modifier les propriétés rhéologiques du fluide dans lequel ils sont placés. Les propriétés rhéologiques de suspensions de particules sphériques rigides sont bien décrites par la loi semi-empirique de Krieger et Dougherty [42] :

$$\eta_{eff} = \eta_0 \left(1 - \frac{\phi}{\phi_m}\right)^{-\alpha\phi_m} \quad (I.1)$$

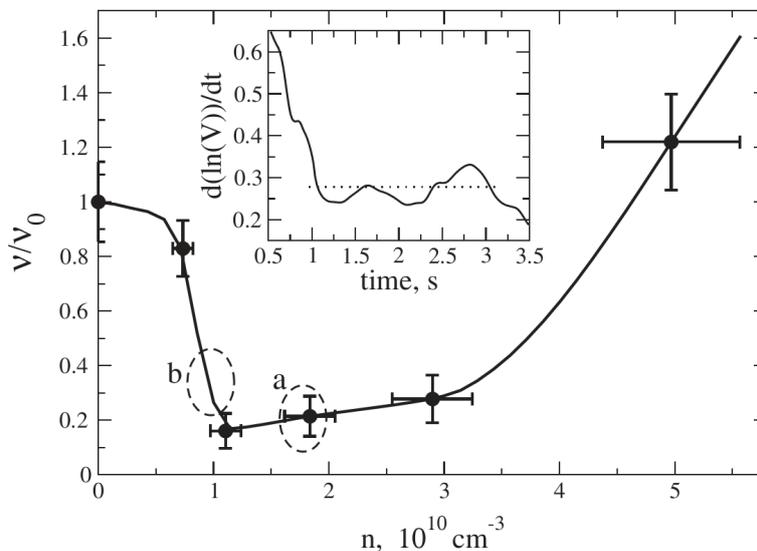
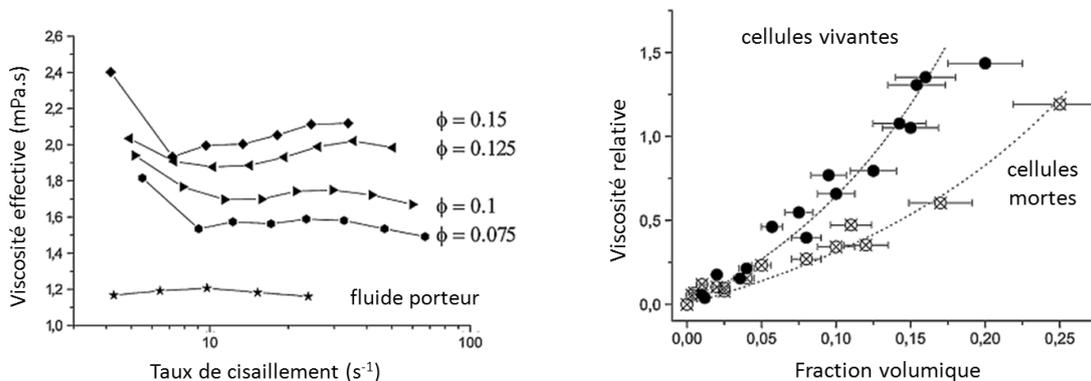


FIGURE 5. Réduction de la viscosité dans une suspension de bactéries *Bacillus Subtilis* en film épais. La viscosité effective de la suspension a été mesurée en générant un tourbillon de taille grande devant la taille des bactéries dans un film suspendu d'épaisseur contrôlée. En étudiant le temps mis par le tourbillon pour disparaître, il a été possible d'estimer la viscosité de cisaillement de la suspension. La viscosité effective ainsi mesurée décroît lorsque la fraction volumique augmente puis décroît lorsque la suspension devient concentrée. Figure extraite de [70].

La viscosité effective de la suspension est η_{eff} et celle du fluide porteur est η_0 . La fraction volumique de la suspension est ϕ et ϕ_m est la fraction volumique maximale accessible au système. α est un coefficient qui vaut 2,5 pour une suspension de sphères rigides (coefficient d'Einstein). Cette loi, bien vérifiée expérimentalement n'est plus valide lorsque les particules en suspension ne sont plus inertes. Sokolov et Aranson [70] ont, par une mesure indirecte, montré que la viscosité effective (macroscopique) d'une suspension de *Bacillus Subtilis* décroissait lorsque l'on augmentait la fraction volumique ϕ à partir d'un certain seuil, avant de ré-augmenter ensuite (figure 5).

Rafaï et al. ont mesuré en utilisant de la rhéométrie standard que la viscosité effective d'une suspension de micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*

3. MODÉLISATION DE CES PHÉNOMÈNES



(a) Viscosité effective à différentes fractions volumiques en cellules vivantes. (b) Viscosité relative en fonction de la motilité des cellules et de la fraction volumique.

FIGURE 6. Augmentation de la viscosité effective avec la motilité des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*. (6a) Viscosité effective de la suspension en fonction du taux de cisaillement, à différentes fractions volumiques ϕ en cellules vivantes. La viscosité du fluide porteur est visible en bas de la figure. (6b) Écart relatif entre la viscosité effective de la suspension et la viscosité du fluide porteur (mesurée à un taux de cisaillement de 5 s^{-1}). Les points pleins correspondent à des suspensions de cellules vivantes et les points barrés à des suspensions de cellules mortes. Les lignes pointillées sont des ajustements des points expérimentaux par la loi de Krieger et Dougherty (équation I.1) en prenant ϕ_m égal à 0,62 (fraction volumique d'empilement maximal aléatoire). L'ajustement donne un coefficient α de 2,5 (identique au coefficient d'Einstein pour les sphères dures) dans le cas des cellules mortes et de 4,5 dans le cas des cellules qui nagent. La viscosité effective de la suspension a été mesurée à l'aide d'un rhéomètre avec une géométrie de type cône-plan. Figure adaptée de [54].

3 Modélisation de ces phénomènes

Il existe plusieurs « ingrédients » pouvant potentiellement conduire aux phénomènes que nous venons d'évoquer. Les principaux sont les interactions de nature hydrodynamique entre les nageurs, les interactions stériques entre nageurs, les caractéristiques biologiques des nageurs (« tumbling » des bactéries) et l'utilisation de tactismes (sensibilité aux nutriments présents dans le milieu (chimiotactisme), sensibilité à la concentration en oxygène dans le milieu (aérotactisme), sensibilité à la gravité (gravitactisme), sensibilité à une molécule sécrétée par les micro-organismes eux-mêmes (« Quorum sensing »)). À cela on peut ajouter la géométrie de la suspension (confinement en 2D par exemple). Il n'est pas évident de déterminer les causes de ces phénomènes et il est probable que plusieurs scénarios aboutissent aux mêmes effets. Une chose est certaine cependant, l'auto-propulsion est le pilier de cette dynamique.

CHAPITRE I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Plusieurs théories ont été élaborées au cours de ces dernières années pour comprendre et reproduire ces phénomènes singuliers. Les premiers modèles élaborés pour reproduire un maximum des propriétés collectives observées des objets auto-propulsés datent d'une vingtaine d'années. Vicsek et al. ont développé un modèle d'« essaim » (« flocks » en anglais) qui a permis de reproduire les caractéristiques de déplacement en groupe de ce type de système [81]. Le principe d'interaction entre objets de ce modèle est simple. À chaque instant, la direction de déplacement d'un objet devient égale à la direction moyenne de ses voisins. Un bruit de moyenne nulle est ajouté à son orientation pour que le système continue à évoluer avec le temps. D'autres modèles similaires ont été développés [76, 77], mais ils n'incluaient pas les interactions hydrodynamiques entre particules en suspensions dans un fluide. Ils modélisaient des objets se déplaçant dans un milieu passif, dont le seul effet était une force de friction sur les objets.

Plus récemment, Sijma et Ramaswamy ont développé un modèle de particules auto-propulsées prenant en compte un milieu ambiant de type fluide [68, 26, 55]. Dans ce modèle, ils s'intéressent à l'effet moyen du mécanisme générant la propulsion de la particule sur le fluide environnant. Pour cela, ils modélisent une particule auto-propulsée par un dipôle de force (figure 7). Une des forces correspond à la force moyenne appliquée par la particule sur le fluide pour se déplacer et la seconde correspond à la force de friction moyenne du corps de la particule sur le fluide (en réaction au déplacement de la particule dans le fluide). Les auteurs distinguent alors deux types de particules actives : celles qui tirent le fluide devant elles pour se déplacer (micro-algue *Chlamydomonas Reinhardtii* par exemple) et celles qui poussent le fluide derrière elle pour se déplacer (spermatozoïde, bactéries *Escherichia Coli* et *Bacillus Subtilis*). La première catégorie prend le nom de « puller » et la seconde de « pusher ». Les puller sont représentés par un dipôle dont les forces pointent l'une vers l'autre et les pusher par un dipôle dont les forces pointent dans des directions opposées. Dans leur modèle, ils calculent la contribution de la distribution de dipôles de force, au tenseur des contraintes du système « fluide + particules », en utilisant une méthode de coarse-graining. D'autres méthodes de calcul de cette contribution ont également été développées par la suite [62, 63]. Ce type de modélisation de l'activité des objets auto-propulsés par des dipôles de force est très répandu à présent [65, 66, 62, 63, 64, 68, 27, 80, 28, 30, 73, 3, 2]. Il permet de donner une explication qualitative de la modification de la viscosité effective d'une suspension suivant le type de nageurs (pusher ou puller) qu'elle contient. Si l'on part de l'hypothèse que les nageurs sont des objets allongés, alors lorsqu'ils sont placés dans un écoulement de cisaillement, ils passent plus de temps alignés dans la direction élongationnelle de l'écoulement que dans une autre direction [34]. Dans cette configuration, le champ de vitesse généré par un puller s'oppose à l'écoulement, alors que celui généré par un pusher va dans le même sens. Un puller fait augmenter la viscosité effective de l'écoulement en s'opposant à lui, alors qu'un pusher diminue cette viscosité. Avec ce raisonnement, si le nageur est sphérique, il n'a pas d'orientation préférentielle dans le cisaillement et son activité n'influence donc pas la viscosité effective du fluide, par rapport au cas d'un objet de forme similaire inerte [33, 24]. Pour le cas des particules

3. MODÉLISATION DE CES PHÉNOMÈNES

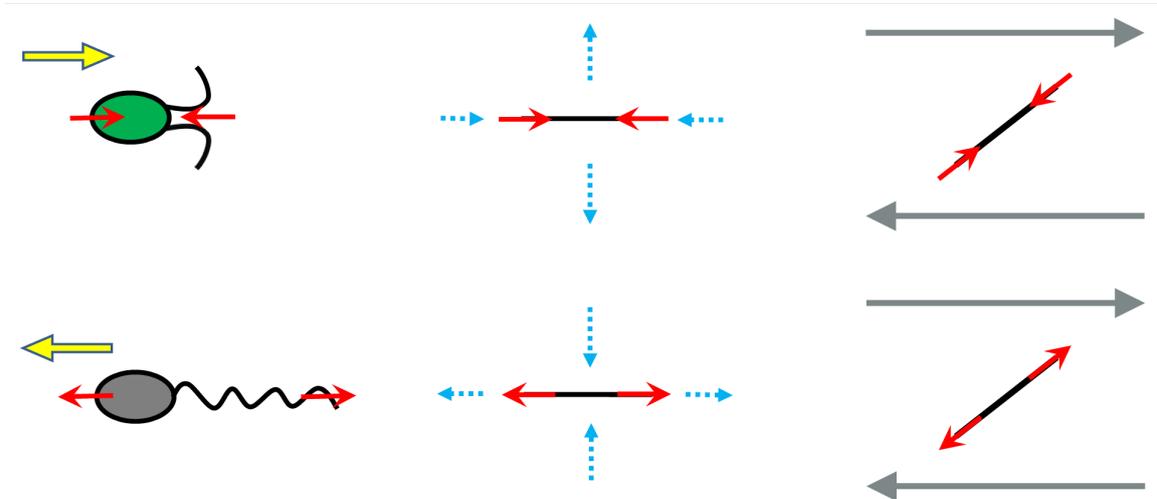


FIGURE 7. Modélisation de micronageurs caractéristiques par des dipôles de force et configuration dans un écoulement de cisaillement imposé. À gauche : Micronageurs de type puller (micro-algue *Chlamydomonas Reinhardtii*, en haut) et pusher (spermatozoïde, en bas). La flèche au dessus de chaque nageur modèle indique le sens de déplacement de l'objet. Les flèches rouges sur le corps des nageurs sont les forces moyennes exercées par le nageur sur le fluide autour de lui. Le puller tire le fluide devant lui et tire son corps dans le fluide. Le pusher pousse le fluide derrière lui et pousse son corps à travers le fluide devant lui. Au centre : Représentation des nageurs par leur dipôle de force correspondant (contractile pour le puller et extensile pour le pusher). Les flèches en pointillé autour des dipôles représentent la direction locale du champ de vitesse généré par chaque dipôle de force dans le fluide qui l'entoure. À droite : Nageurs modèles dans un écoulement de cisaillement imposé. Un objet de forme allongée s'aligne préférentiellement dans la direction élongationnelle de l'écoulement. Si l'on considère que cet alignement persiste pour un objet de type actif, on voit que le nageur de type puller (en haut) va agir dans le sens contraire de l'écoulement, alors que le pusher (en bas) va pousser le fluide dans la direction de l'écoulement.

actives de forme allongée, il reste à vérifier expérimentalement qu'elles restent bien alignées plus longtemps dans la direction élongationnelle de l'écoulement que dans les autres directions. Rafai et al. avaient observé en suspension diluée que le puller *Chlamydomonas Reinhardtii* semblait résister à la rotation imposée par l'écoulement auquel il était soumis [54].

L'explication de la modification de la viscosité que nous venons d'évoquer n'est pas directement applicable à une suspension semi-diluée à concentrée. Dans ce raisonnement, un seul micro-nageur était considéré dans l'écoulement de cisaillement. Pour des fractions volumiques plus importantes, les interactions hydrodynamiques vont modifier la distribution d'orientation des nageurs par rapport au cas dilué. Pour mesurer l'importance de ces interactions, Drescher et al. [16] et parallèlement Guasto et al. [22] ont mesuré expérimentalement le champ de vitesse entourant les

CHAPITRE I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Chlamydomonas Reinhardtii en utilisant des traceurs fluorescents clairsemés dans la suspension et en suivant simultanément les positions des algues et les positions des traceurs. Drescher et al. ont effectué une mesure du champ de vitesse moyenné sur la durée d'un battement de flagelles. Ils ont constaté que le champ de vitesse moyen entourant ce micro-nageur pouvait être modélisé comme le champ généré par un ensemble de trois forces, au lieu des deux généralement utilisées pour modéliser une particule active. En effet, d'après leurs mesures, la description du champ de vitesse autour d'une *Chlamydomonas Reinhardtii* en terme de dipôle de force ne serait valide qu'à partir d'une distance supérieure à environ 7 rayons de l'algue. De plus, à partir de cette distance de l'algue, la perturbation occasionnée par l'algue dans le fluide n'est plus que de 1 % de sa vitesse de déplacement moyenne. Les auteurs concluent leur article en disant qu'étant donné l'extension spatiale du champ de vitesse des *Chlamydomonas Reinhardtii*, celles-ci doivent pourvoir interagir de manière hydrodynamique entre elles. Ils ont conduit la même étude sur la bactérie *Escherichia Coli* [15]. Ils ont observé que l'amplitude du champ de vitesse généré par ce micro-nageur de type « pusher » décroissait en $1/R^2$ avec R la distance au centre du micro-nageur. Cette observation est en accord avec la modélisation classique d'un micronageur de type « pusher » par un dipôle, excepté en dessous d'une distance inférieure à $6 \mu\text{m}$ où le modèle surestime la valeur du champ de vitesse. La conclusion de leur étude est que pour que ce type de nageur interagisse de manière hydrodynamique avec ses voisins, il faut que la fraction volumique en bactéries soit élevée. Ils soulignent que même dans ce cas, l'interaction hydrodynamique n'est pas l'interaction dominante puisqu'à l'échelle de distance de séparation à partir de laquelle ils sont supposés interagir (quelques microns), la présence des flagelles et des interactions stériques vont être bien plus marquantes. Cela suggère donc que les mécanismes d'organisation collective observés jusqu'à présent pour ces micro-nageurs seraient principalement dus aux interactions proches de type stériques entre nageurs. Ainsi, les propriétés des phénomènes collectifs observés seraient du même type que ceux observés dans des bancs de poissons, d'animaux en groupes et donc ne nécessiteraient pas une description hydrodynamique [77]. La question de la modification de la viscosité dans une suspension semi-diluée à concentrée reste également ouverte. Pour ces fractions volumiques, peut-on considérer que la distribution d'orientation de particules actives de forme allongée, dans un écoulement imposé est anisotrope ? Quelles pourraient en être les raisons ? La réduction de la viscosité chez les pusher en suspension semi-diluée serait-elle liée à un phénomène de type « mouvement collectif », basé sur un mécanisme d'alignement des nageurs entre eux dû principalement à des interactions stériques ? L'augmentation de la viscosité dans les suspensions de puller serait-elle principalement due à leur extension spatiale effective ? Ces suspensions pourraient-elles être le siège de mouvements collectifs ?

Les résultats de l'étude de Drescher et al. et Guasto et al. suggèrent que les pullers (représentés par les *Chlamydomonas Reinhardtii*) sont susceptibles d'interagir entre eux de manière hydrodynamique. En effet leur champ de vitesse s'étend à une distance importante autour d'eux. La forme des champs de vitesse qu'ils génèrent est différente de celle dont les dotaient les modèles jusqu'à récemment. Il peut donc être

3. MODÉLISATION DE CES PHÉNOMÈNES

intéressant de vérifier expérimentalement si ces nageurs peuvent interagir de manière hydrodynamique et si leurs interactions peuvent conduire à des mouvements collectifs. C'est ce que nous allons voir dans la suite de cette étude. Nous allons étudier un micro-nageur de type « puller » et nous allons observer si ce type de nageur peut générer des phénomènes collectifs lorsque la fraction volumique de la suspension dans laquelle il évolue est suffisamment élevée.

CHAPITRE I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Chapitre II

Matériels et méthodes

Sommaire

1	Le micro-nageur <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	20
1.1	<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> , un micro-nageur modèle . . .	20
1.2	Cultures biologiques de micro-algues	23
2	Préparation des suspensions de micro-algues pour l'ob- servation en microscopie	27
2.1	Récolte de la culture de micro-algues	27
2.2	Mesure de la fraction volumique d'une suspension de micro- algues	27
2.3	Préparation de la cellule d'observation	28
3	Observation de micro-nageurs en microscopie	29
4	Reconstruction des trajectoires des micro-nageurs à par- tir de films	29
4.1	Travail des images	30
4.2	Détection des particules	30
4.3	Connexion des positions successives en trajectoires	37
4.4	Filtrage des particules immobiles	38
4.5	Analyse 2D d'un système 3D	38
	Annexes	43
A	Composition et préparation du milieu de culture TAP . . .	43
B	Préparation des boîtes de culture sur milieu solide . . .	44
C	Calendrier de repiquage des cultures	44
D	Caractéristiques des caméras utilisées nécessaires à l'ana- lyse des données	45

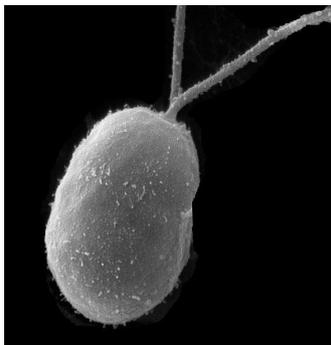


FIGURE 1. Micro-algue verte *Chlamydomonas Reinhardtii* observée au microscope électronique à balayage (grossissement $\times 10000$). L'algue est pourvue de deux flagelles antérieurs qui lui permettent de se déplacer avec un mouvement de brasse. Elle est également pourvue d'un stigma (oeil rudimentaire) sur le côté de son corps, sous un de ses flagelles, qui lui permet de détecter les sources lumineuses (image : Dartmouth College, L. Howard).

1 Le micro-nageur *Chlamydomonas Reinhardtii*

1.1 *Chlamydomonas Reinhardtii*, un micro-nageur modèle

Pour l'étude des suspensions actives, notre choix s'est porté vers le micro-nageur *Chlamydomonas Reinhardtii*, une micro-algue verte de la famille des Chlorophyceae [25]. Ce micro-organisme est un bon système modèle pour une étude physique car il est quasi-sphérique, et facile à cultiver. Il est possible d'étudier des suspensions sans que ne survienne la formation de biofilms comme ce peut être le cas pour les bactéries, et sans que n'apparaissent des bulles dans le système comme ce peut être le cas avec des particules Janus. De plus grâce à la synchronisation de ces algues, il est possible d'obtenir des cellules de taille monodisperse et qui ne se divisent pas pendant la durée de l'expérience.

1.1.1 Structure de cette micro-algue

Il s'agit d'un organisme unicellulaire composé d'un corps pratiquement sphérique d'environ $10 \mu\text{m}$ de diamètre et de deux flagelles antérieurs de longueur de l'ordre de $12 \mu\text{m}$ implantés l'un à proximité de l'autre (figure 1). Sa densité est supérieure de 4 % par rapport à celle de l'eau.

Le mouvement de cette algue est peu sensible à l'agitation brownienne. Si l'on considère une cellule immobile sphérique de rayon R avec un excès de densité $\Delta\rho$ par rapport au fluide dans lequel elle baigne, celle-ci va sédimenter sous l'effet de l'accélération de la pesanteur \mathbf{g} . Elle sera également agitée et freinée par les molécules du fluide l'environnant. Considérons la distance moyenne $l_s(t)$ qu'elle parcourrait en un temps t en sédimentant, sans subir l'agitation des molécules du fluide tout en

1. LE MICRO-NAGEUR *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

subissant leur friction. Pour déterminer l'importance des phénomènes s'exerçant sur elle, on peut comparer la distance $l_s(t)$ à la distance moyenne $l_b(t)$ de laquelle elle se serait déplacée au bout d'un temps t sous l'effet de l'agitation brownienne en absence de sédimentation. La vitesse v_s à laquelle sédimente une cellule en présence d'une force de friction et sous l'action combinée de la force d'Archimède et de son poids est donnée par :

$$\mathbf{v}_s = \frac{2}{9} \frac{R^2 \Delta \rho}{\eta} \mathbf{g} \quad (\text{II.1})$$

La distance parcourue au bout d'un temps t est donc :

$$l_s = \frac{2}{9} \frac{\Delta \rho g}{\eta} R^2 t \quad (\text{II.2})$$

Pour la distance moyenne parcourue sous l'effet du mouvement Brownien, on peut prendre la racine carrée du déplacement quadratique moyen soit :

$$l_b = \sqrt{\langle r^2(t) \rangle} = \sqrt{6Dt} = \sqrt{\frac{k_b T}{\pi \eta R}} t \quad (\text{II.3})$$

avec k_b et T la constante de Boltzmann et la température. La distance l_b sera donc négligeable devant la distance l_s lorsque le temps t sera grand devant le temps τ avec :

$$\tau = \frac{36\pi\eta R k_b T}{V_c^2 \Delta \rho^2 g^2} \quad (\text{II.4})$$

Pour les dimensions des algues et leur excès de densité par rapport à l'eau, cela donne un temps τ de l'ordre du centième de seconde. Donc sur une échelle de temps supérieure à un centième de seconde, même pour une algue morte, il est difficile d'observer un comportement Brownien. Pour une bactérie *Escherichia Coli* en revanche, ce temps devient de l'ordre de la seconde. Sa dynamique de nage est donc bien plus susceptible d'être affectée par le mouvement Brownien que celle des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*.

1.1.2 Motilité

À l'aide de ses deux flagelles antérieurs, *Chlamydomonas Reinhardtii* se déplace grâce à un mouvement de « brasse » en tirant le fluide situé devant elle. Typiquement ses deux flagelles battent à une fréquence de l'ordre de 30 Hz. Ce type de battement lui permet de se déplacer de plusieurs diamètres par seconde. La forme quasi-sphérique de *Chlamydomonas Reinhardtii* et le fait qu'elle possède seulement deux flagelles fins devant la taille de son corps, en fait un micro-nageur aisé à modéliser et à comparer avec les lois de l'hydrodynamique. Elle est un des nageurs de type « puller » le plus simple à modéliser.

1.1.3 Sensibilité à des stimulus extérieurs : tactismes

Un « tactisme » est un déplacement orienté en réaction à un stimulus extérieur. Ces algues disposent d'un stigma (oeil rudimentaire) situé sur le côté de leur corps sous un des flagelles leur permettant de détecter des sources lumineuses. Cela leur permet de détecter la direction d'une source lumineuse et en cas d'éclairement peu intense de se diriger vers elle. Lorsque le stigma reçoit de la lumière, cela active un système signalétique chimique utilisant des ions calcium qui modifie le mécanisme de battement des flagelles asymétriquement, permettant à la cellule d'effectuer une rotation pour s'orienter vers une source lumineuse peu intense.

En cas d'illumination trop importante, l'oeil génère cette fois-ci une réponse qui fera s'éloigner l'organisme de la source lumineuse (phototactisme négatif), voire même en générant un mouvement de nage des flagelles totalement différent du mouvement de nage habituel pour quelques secondes (ondulation des flagelles pour un déplacement en marche arrière [56]).

Les *Chlamydomonas Reinhardtii* sont très peu sensibles à la lumière dont la longueur d'onde est supérieure à celle de la lumière rouge. La souche que nous avons utilisée est peu phototactique, mais nous avons tout de même utilisé un filtre rouge (autant que possible) pour éviter que leur sensibilité à la lumière ne vienne perturber l'étude.

Il existe d'autres formes de tactismes. La dynamique de ces algues dépend également de certains facteurs extérieurs autres que la lumière. Par exemple le chimiotactisme a été étudié chez ces cellules [25]. Des études ont été menées pour voir à quelles espèces chimiques ces algues sont sensibles et si elles arrivent à repérer des sources de nutriments [69].

Une autre forme de tactisme est à noter, le gravitactisme, soit la sensibilité à la gravité. Ce tactisme entraîne que ces algues nagent préférentiellement contre la gravité. Cela peut être dû à un phénomène d'asymétrie de densité et/ou de forme de la cellule [50, 57]. On notera également le gyrotactisme, qui est un comportement généré par deux mécanismes : le couple auquel est soumis un micro-nageur dont le centre de masse est situé en arrière de son centre géométrique, sous l'action de la gravitation et un couple de nature visqueuse dû à un écoulement autour du micro-nageur [38].

Ces mécanismes de tactismes font que la dynamique de déplacement de ces nageurs est très complexe. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes placés autant que possible dans une situation isotrope afin de pouvoir désigner sans ambiguïté les causes des phénomènes observés.

1.1.4 Autres propriétés

Au-delà du cadre de notre étude, cette algue possède plusieurs autres propriétés intéressantes. Son génome a été étudié longuement à cause de ses facultés d'adaptation très impressionnantes. En effet, elle peut vivre dans des conditions extrêmement variées de température et de pression, depuis le désert aux neiges fondantes en al-

1. LE MICRO-NAGEUR *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

titude et il est même possible d'en trouver dans les airs¹, ce qui fait de ce type de micro-algue un organisme capable d'aller se développer loin de son lieu de culture originel.

De plus, cette algue réalise la photosynthèse grâce à son chloroplaste. Elle est un candidat plausible à la production de bio-carburants de troisième génération. Des études sur le sujet sont en cours [9, 61].

1.2 Cultures biologiques de micro-algues

D'un point de vue expérimental, ces micro-nageurs sont très pratiques car ils sont faciles à produire en laboratoire à partir d'une souche de base. La souche de *Chlamydomonas Reinhardtii* que nous avons utilisée est la souche sauvage WT122⁺. Nous l'avons obtenue auprès de l'IBPC². Toutes nos cultures de *Chlamydomonas Reinhardtii* ont été réalisées en milieu TAP (Tris-Acetate-Phosphate) dont la composition et la préparation sont données dans l'annexe A.

Nous avons cultivé les algues dans un incubateur Memmert ICP 500 de manière synchrone avec un cycle jour-nuit de 14h-10h (figure 2) à une température de 22 °C (figure 3). Le cycle de jour démarrait à 6h le matin pour que les algues soient utilisables pour les expériences dans de bonnes conditions de nage à 10h du matin. L'illumination a été assurée par un module néon avec une puissance éclairante de 1000 Lux. Pour renouveler l'air présent dans l'incubateur, le système de ventilation a été réglé à un niveau moyen.

La première phase de la culture est d'abord réalisée en milieu solide sur une couche de milieu de culture TAP gélifié avec de l'agar-agar, dans une boîte de Petri (figure 3). La méthode de préparation des boîtes de culture est en annexe A.

Les souches de *Chlamydomonas Reinhardtii* que nous a fournies l'IBPC étaient sous forme de culture sur gel. Pour perpétuer ces cultures, nous relançons de nouvelles cultures à partir des boîtes précédentes. Pour démarrer une nouvelle culture sur gel, il suffit de prélever un petit volume d'algues sur une boîte précédente et de l'appliquer à la surface du gel d'une nouvelle boîte. Les cultures sur gel ont été relancées chaque semaine pour assurer la viabilité des algues utilisées pour initier les cultures liquides.

1.2.1 Synchronisation des cultures de micro-algues

Pour obtenir des suspensions de micro-algues, nous avons d'abord lancé une première culture liquide (pré-culture) à partir de laquelle nous en avons lancé une deuxième que nous avons utilisée pour notre étude.

Le but de la pré-culture est d'obtenir des cellules qui se divisent au même moment (culture synchrone) et dont la taille est peu dispersée. Outre l'importance capitale

1. Des variétés de *Chlamydomonas* se sont développées sur une boîte de Petri stérile exposée ouverte pendant une minute lors d'un vol à 1 km d'altitude [7].

2. Institut de Biologie Physico-Chimique, Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste, CNRS UMR7141 Paris, contact : Sandrine Bujaldon.

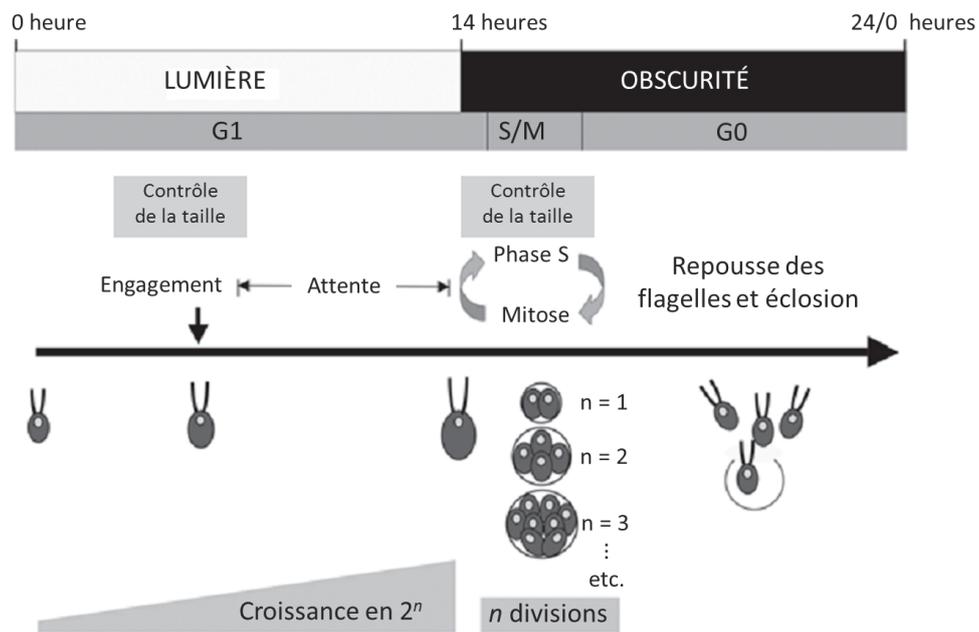


FIGURE 2. Cycle de division des *Chlamydomonas Reinhardtii* dans le cas d'une culture synchrone avec alternance de phases jour/nuit de durées respectives 14 h/10 h. Les cellules croissent pendant la phase G1, jusqu'à une certaine taille critique. À ce moment là, la cellule s'engage dans le processus de division, lequel débute seulement au début de la phase d'obscurité. Il s'ensuit n cycles de mitose, n dépendant de la taille initiale de la cellule mère. Dans notre cas, les cellules se multiplient à raison de $n = 2$ divisions par nuit en moyenne. Une cellule se transforme donc en quatre cellules. Après les cycles de mitose, les flagelles des cellules filles se mettent à pousser et la cellule mère éclot. Figure adaptée de [25].

1. LE MICRO-NAGEUR *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*



FIGURE 3. Culture des *Chlamydomonas Reinhardtii*. Dans la partie haute de l'incubateur, on peut voir les cultures sur milieu gélifié enfermées dans des boîtes de Petri fermées par du film Parafilm. Dans la partie basse se trouvent des cultures en phase liquide contenues dans des erlenmeyers stériles fermés par du papier aluminium, contenant chacun un barreau magnétique, et disposés sur un agitateur magnétique à six rotors. Les cultures en milieu liquide sur la photo sont en phase de croissance exponentielle (couleur vert « lumineux »). L'éclairage est assuré par un bloc de six néons disposés au fond de l'incubateur.

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

que la suspension soit monodisperse pour que la taille des cellules soit connue précisément pour notre étude, l'intérêt des cultures synchrones est de pouvoir étudier des suspensions de cellules pendant un temps de l'ordre de quelques heures dans une situation stationnaire. Pendant la nuit, les cellules se divisent environ deux fois chacune pour donner naissance à quatre nouvelles cellules (figure 2). Pendant la phase diurne, la motilité et le nombre de cellules ne varient presque pas. Les cellules se divisant seulement la nuit, leur nombre est constant le jour. La motilité quant à elle dépend beaucoup de l'état des stocks de nutriments de la cellule. Pour effectuer des études reproductibles de la motilité, les cellules doivent avoir des stocks suffisants. Lorsque le stock est suffisant, la motilité des cellules dans une culture est stable à partir de 4h après la fin de la période de nuit jusqu'à 2-3h avant la fin de la période de jour d'après nos observations. Pour le cycle jour-nuit 14h/10h que nous utilisons, les cellules sont utilisables dans des conditions de motilité reproductibles pendant une durée de 7-8h. Le synchronisme de la culture est assuré par le cycle jour/nuit imposé [25].

La taille des cellules dépend principalement de l'abondance des réserves nutritives du milieu dans lequel elles sont et de l'utilisation des stocks de nutriments que la cellule a emmagasinés. En pratique, les cellules doivent nager plusieurs heures dans un milieu privé de nutriments pour que l'on observe une modification notable de leur taille [25]. Pour imposer la même taille à toutes les cellules, on laisse la pré-culture atteindre un état dans lequel les cellules n'ont presque plus de stock de nutriments. Ainsi leur taille réduite est la même pour toute la population. Ensuite, une fraction de cette pré-culture est introduite dans un milieu nutritif frais pour préparer la culture en milieu liquide qui sera utilisée lors de l'étude, et incubée pendant 3 jours. Le synchronisme de la culture est encore renforcé par le placement d'algues ayant presque épuisé leurs ressources énergétiques dans un milieu riche en nutriment [25].

Les conditions d'incubation de la culture et de la pré-culture sont les mêmes que celles utilisées pour la culture gel. Pour améliorer l'efficacité de division des cellules, nous avons agité doucement les suspensions via un système d'agitation magnétique. Nous avons utilisé une vitesse de rotation de 100 tours/minute pour brasser la suspension sans trop perturber les cellules. L'agitateur magnétique a été utilisé à sa puissance magnétique au minimum pour éviter l'échauffement par contact de l'erlenmeyer contenant la suspension. Pour initier une pré-culture, nous avons prélevé une faible quantité d'algues (typiquement $1/4 \text{ mm}^3$) provenant d'une culture en milieu gel datant d'une semaine et l'avons placée dans un volume de 50 mL de milieu TAP. La pré-culture est incubée typiquement pendant trois jours. Passé ce délai, les réserves nutritives du milieu sont pratiquement épuisées et les cellules privées de nutriments sont toutes de petite taille. Quatre heures après le début du cycle de jour, une fraction de la pré-culture est réintroduite dans du milieu frais (on effectue typiquement une dilution au cinquantième de la pré-culture pour lancer la deuxième culture liquide).

Au bout de 2 à 3 jours d'incubation (suivant la fraction de cellules vivantes que l'on a introduite au départ dans la deuxième culture liquide), on obtient une

2. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE MICRO-ALGUES POUR L'OBSERVATION EN MICROSCOPIE

culture de couleur vert transparent « lumineux »³ dont la population est en phase de croissance exponentielle (concentration en cellules de l'ordre de 10^6 cellules/mL). A ce stade, les algues sont à un niveau de motilité et de synchronisation optimal. De plus, elles sont de dimensions similaires puisque leurs ancêtres sont toutes parties d'un état similaire au début de la deuxième culture.

2 Préparation des suspensions de micro-algues pour l'observation en microscopie

2.1 Récolte de la culture de micro-algues

Lorsque les cultures sont prêtes, nous les récoltons et nous en vérifions un échantillon au microscope pour nous assurer qu'il n'y a pas eu de contamination, que la culture contient peu de cellules « palmelloïdes » (i.e. cellules qui se seraient mal séparées lors de leur dernière division) et que les cellules ont pratiquement toute la même taille.

Ensuite, la culture est centrifugée à une accélération de 120 g pendant 10 minutes. Le liquide surnageant est remplacé par du milieu de culture frais. Le concentré d'algues est resuspendu en douceur par agitation et la culture est laissée en repos pendant une heure dans le noir pour que la fraction d'algues mortes présentes dans la suspension tombe au fond. Cette fraction est faible mais la présence de cellules inertes dans la suspension est gênante pour l'analyse de la dynamique dans la suite. On utilise ensuite pour la préparation des échantillons la partie haute du tube que l'on a laissé décanter.

2.2 Mesure de la fraction volumique d'une suspension de micro-algues

Pour mesurer la fraction volumique d'une suspension, on peut citer deux méthodes.

On peut simplement placer un volume connu d'algues fixées dans une chambre de comptage, puis compter les algues et remonter à leur fraction volumique.

Il est également possible d'estimer la fraction volumique d'une suspension en utilisant la spectrophotométrie d'absorbance. Le principe de cette technique est que l'absorbance d'une solution à une certaine longueur d'onde est reliée directement à la concentration en objets absorbants présents dans la suspension par la loi de Beer-Lambert. On peut réaliser une courbe de calibration pour le type de suspensions qui nous intéresse (ici en l'occurrence une suspension de micro-nageurs *Chlamydomonas Reinhardtii*) dont on connaît la fraction volumique (estimée par comptage par exemple) et dans une gamme de fraction volumique pas trop élevée (sinon la loi de Beer-Lambert cesse d'être valide et la précision de la mesure se dégrade). Il

3. Voir la figure 3.

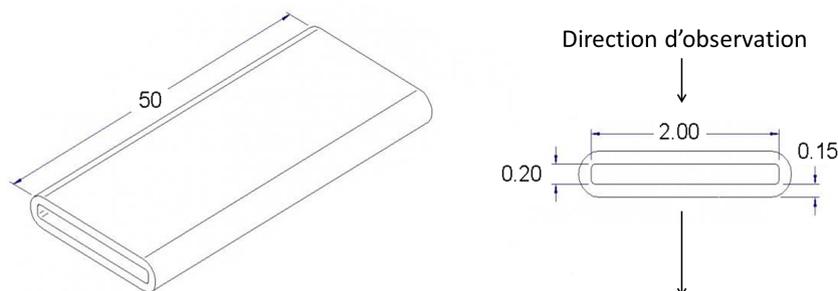


FIGURE 4. Forme et dimensions des capillaires en verre borosilicate utilisés pour l'étude de la dynamique des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*. Les dimensions indiquées sur la figure sont en mm. Sur cette représentation, l'échelle pour la longueur du tube est différente de celle de la largeur et de la hauteur. Le capillaire est bien plus fin qu'il ne le paraît sur la figure de gauche (rapport d'aspect longueur sur largeur 50 : 2).

est ainsi possible d'estimer rapidement la concentration en micro-algues dans cette suspension avec cette méthode.

Nous avons privilégié la méthode de comptage pour toutes les mesures des fractions volumiques des suspensions que nous avons utilisées car cette méthode est utilisable directement pendant les mesures en microscopie. Le nombre de cellules est compté dans la zone d'observation du dispositif et est ramené au volume de cette zone d'observation pour déterminer la fraction volumique.

2.3 Préparation de la cellule d'observation

Pour l'étude des suspensions de micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*, nous avons utilisé des micro-capillaires en verre borosilicate (VitrotubesTM) de forme rectangulaire avec des bords arrondis (figure 4). Nous avons choisi des capillaires d'une profondeur suffisante (environ vingt diamètres d'algues) pour éviter les effets de bord et nous avons effectué nos observations au centre de ce canal. La largeur du capillaire a permis également que la fenêtre d'observation de la caméra soit assez loin des parois, pour éviter les effets de bords dans la direction normale au capillaire. Nous avons choisi un capillaire plat pour éviter d'introduire des aberrations géométriques dans le système optique. Étant donnée la taille réduite du capillaire, les mouvements de convection thermique ne jouent aucun rôle ici. De plus, lors de nos expérimentations, le microscope était entouré d'une chambre isolante et il était placé dans un environnement climatisé à 22 °C. Pour éviter l'adhérence possible des flagelles des algues sur les parois internes des capillaires, ceux-ci ont été traités avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) après avoir été préalablement lavés avec de l'alcool, puis rincés avec du milieu TAP. Les chambres ont été remplies par capillarité. Elles ont ensuite été scellées avec de la pâte à sceller pour hématocrite (Brand GmbH) pour éviter des phénomènes d'évaporation.

3. OBSERVATION DE MICRO-NAGEURS EN MICROSCOPIE

Une bulle d'air a été laissée à chaque extrémité du capillaire (capillaire rempli au tiers de suspension) pour éviter le contact de la suspension avec la pâte à sceller. Après chaque observation, il n'a été constaté aucun phénomène d'accumulation des algues vers les interfaces eau-air à l'intérieur du capillaire.

3 Observation de micro-nageurs en microscopie

Nous avons utilisé pour la visualisation des suspensions un microscope inversé Olympus IX71. Les échantillons ont été observés en utilisant une illumination en champ clair (excepté au chapitre IV où l'imagerie en épifluorescence a été utilisée⁴). Nous nous sommes toujours placés en illumination de Köhler afin d'obtenir un éclairage uniforme de l'échantillon [45]. Nous avons utilisé des objectifs de grossissement allant du x4 au x64 suivant la dynamique que nous avons étudiée. Pour l'illumination des algues nous avons utilisé une lampe halogène de puissance 100W en lumière transmise. Nous avons utilisé cette lampe à la puissance la plus faible possible (environ 20 à 40W suivant la fréquence d'acquisition de la caméra utilisée) qui permettait d'obtenir des images exploitables avec la caméra. Nous avons utilisé un filtre rouge pour éviter tout phénomène de phototactisme car la dynamique des algues n'est pas perturbée pour cette gamme de longueur d'onde.

Pour l'acquisition des images, nous avons utilisé deux caméras différentes, suivant l'échelle de temps des phénomènes à laquelle nous nous sommes intéressés. Nous avons utilisé une caméra rapide à une fréquence d'acquisition de 400 images par seconde (Miro, PhotonLines) dans le cadre de l'étude de la dynamique aux temps courts devant la durée du battement d'un flagelle (typiquement 1/50 s) et nous avons utilisé une caméra CCD sensible (Sensicam qe, PCO) pour les autres études à des fréquences d'acquisition allant de 9 à 18 images par seconde.

Les tailles des pixels des caméras utilisées sont rapportées en annexe D. La sensibilité des caméras que nous avons utilisées dépend de la longueur d'onde de la lumière reçue par les capteurs. Dans le rouge (longueur d'onde aux alentours de 600 nm), la sensibilité de la caméra PCO est bien moins bonne que dans le bleu (450 nm).

4 Reconstruction des trajectoires des micro-nageurs à partir de films

La reconstruction des trajectoires des *Chlamydomonas Reinhardtii* procède de la manière suivante. La position de chaque objet est détectée sur chaque image, puis ces positions sont reliées entre elles d'une image à l'autre afin de reconstruire les trajectoires. Mais avant cela, les films doivent être préparés pour pouvoir être analysés.

4. Plus de détails sur les deux techniques d'imagerie sont disponibles au chapitre IV.

4.1 Travail des images

Les images enregistrées à la sortie de la caméra ne sont pas optimales pour la reconstruction de trajectoires (figure 5a). On retravaille ces images pour améliorer la lisibilité de l'information que l'on veut en tirer (ie la position et l'identification des particules au cours du temps). Pour cela nous avons utilisé le logiciel ImageJ⁵. Pour que l'information contenue dans l'image soit la plus précise possible, les valeurs de niveau de gris des pixels doivent occuper toute la gamme des valeurs disponibles. Nous avons travaillé avec des images codées sur 8 bits, les valeurs de brillance allaient donc de 0 à 255. On optimise l'utilisation de la gamme de valeur de brillance de pixel en utilisant la fonction 'saturate' du logiciel ImageJ (figure 5c). Elle modifie le contraste de l'image. Ensuite on soustrait l'arrière plan de l'image (figure 6a). Il contient du bruit qui pourrait perturber la détection des particules. Enfin, on inverse les valeurs de brillance de l'image pour passer d'une image sur laquelle les objets sont noirs sur fond blanc à une image sur laquelle les objets sont blancs sur fond noir (figure 6c). Une dernière étape peut être ajoutée lorsque cela est nécessaire. Lorsque les acquisitions sont effectuées avec une faible luminosité, il peut arriver que des bandes horizontales de bruit de pixel (ou verticales suivant l'orientation du capteur) soient superposées sur les images. Dans ces cas là, la fonction 'Bandpass Filter' d'ImageJ utilisant la transformée de Fourier permet de les supprimer très facilement sans détériorer la qualité de l'image.

Nous avons automatisé la préparation des images à l'aide de macros dans le langage utilisé par ImageJ (langage dont la syntaxe ressemble à celle du langage JavaScript). La taille caractéristique des objets à conserver lors de la suppression du fond de l'image est déterminée par le programme en fonction de l'objectif de microscope et de la caméra utilisés.

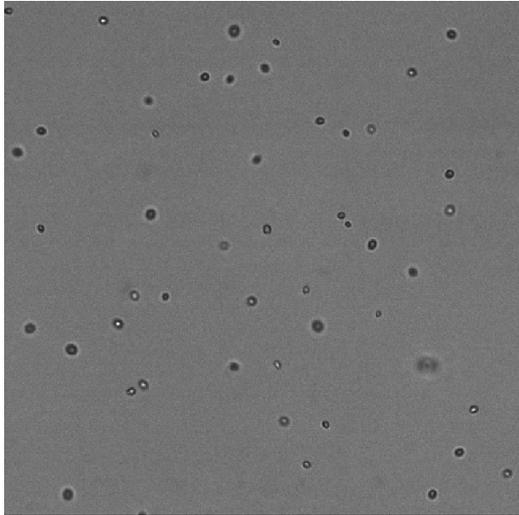
4.2 Détection des particules

Lorsque les films sont préparés, la reconstruction des trajectoires commence par la détection de la position de chaque particule sur chaque image. Pour cela, nous avons adapté les routines développées initialement pour le suivi de particules fluorescentes par John Crocker et David Grier [10] dans le langage IDL⁶. Les routines détectent des points lumineux sur fond sombre dont le profil est approximativement gaussien. Les images des *Chlamydomonas Reinhardtii* que l'on souhaite détecter doivent donc être sous cette forme. Avant de commencer la détection des objets, il reste un léger bruit de fond à éliminer des images comme nous l'avons évoqué au paragraphe précédent. Pour cela, une étape de filtrage supplémentaire est ajoutée avant la détection des objets. La routine 'bpass' [10] utilise une méthode de filtrage basée sur une convolution de l'image par un noyau de type 'chapeau mexicain'. Ce filtre fonctionne de la manière suivante. Il réalise tout d'abord une image que l'on peut considérer comme l'arrière plan de l'image de départ en remplaçant la valeur

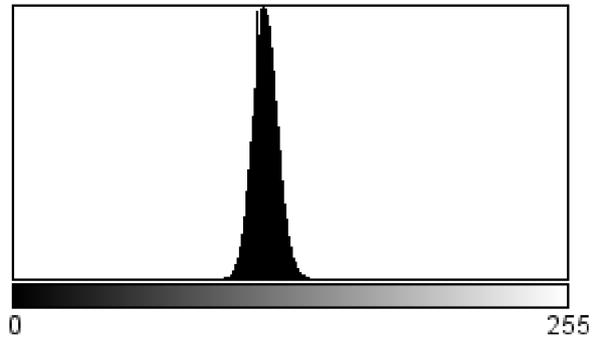
5. ImageJ est un logiciel de traitement d'image dans le domaine public (imagej.nih.gov/ij).

6. IDL (Interactive Data Language) est un environnement de développement très utilisé dans le domaine de l'analyse d'images, notamment en astrophysique et en Sciences de la Terre.

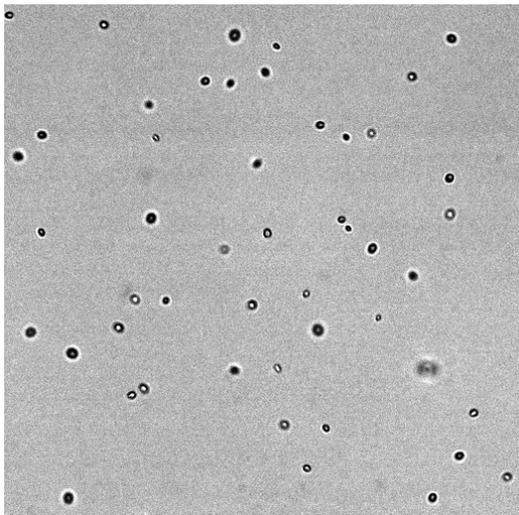
4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS



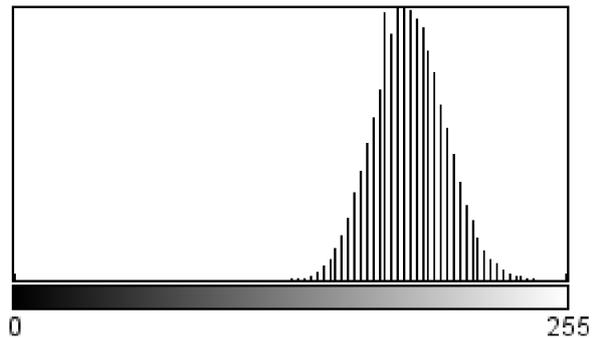
(a) Image brute.



(b) Histogramme des valeurs des pixels de l'image.

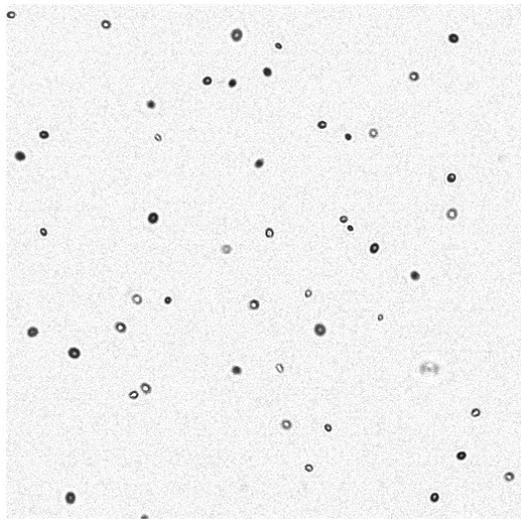


(c) Contraste ajusté.

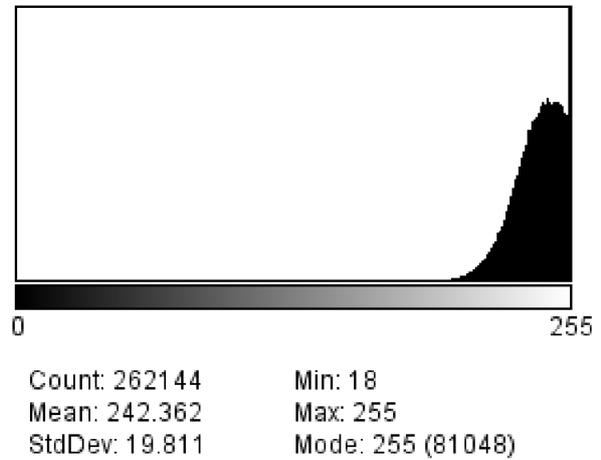


(d) Histogramme des valeurs des pixels de l'image.

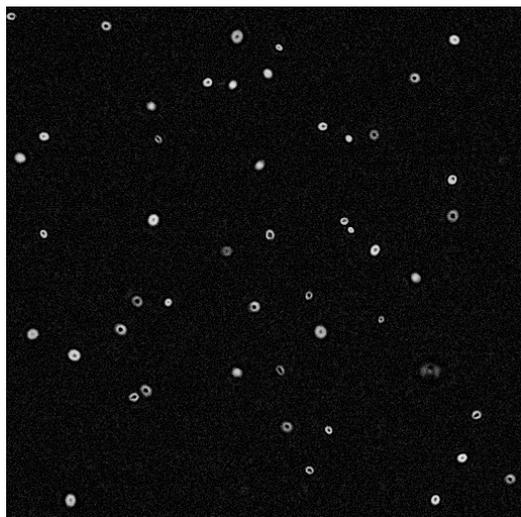
FIGURE 5. Image brute, puis ajustée en contraste et histogrammes des niveaux de gris correspondants. (5a) La majorité des points de l'image brute ont des valeurs dans les tons gris, (5b) le pic sur l'histogramme correspond à des valeurs de niveaux de gris moyennes. Pour bien distinguer les algues, le fond est censé être clair (valeur de luminosité maximale) et les algues sombres (luminosité proche de 0). La gamme de niveau de gris des pixels n'est pas totalement utilisée. (5c) Après ajustement du contraste par la fonction 'saturate' du logiciel ImageJ, (5d) le pic de l'histogramme correspondant aux points clairs est déplacé vers les plus hautes valeurs. L'échelle des valeurs de niveau de gris des pixels a été recalculée pour optimiser l'utilisation de la gamme de valeur de brillance.



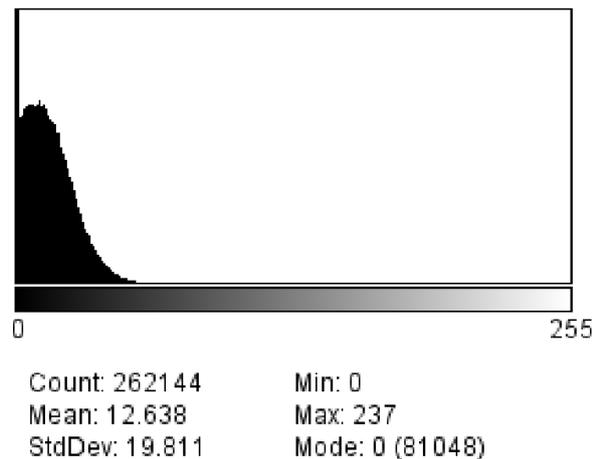
(a) Arrière plan soustrait.



(b) Histogramme des valeurs des pixels de l'image.



(c) Image au contraste inversé.



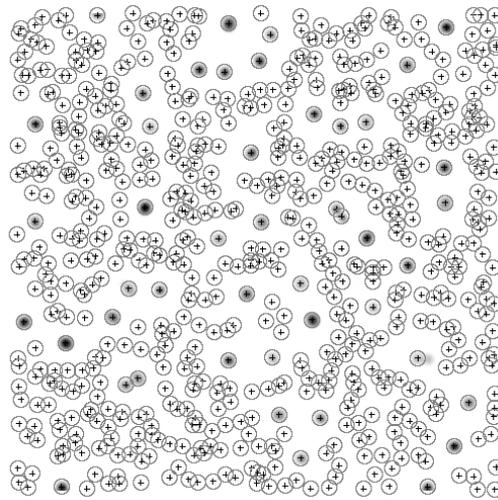
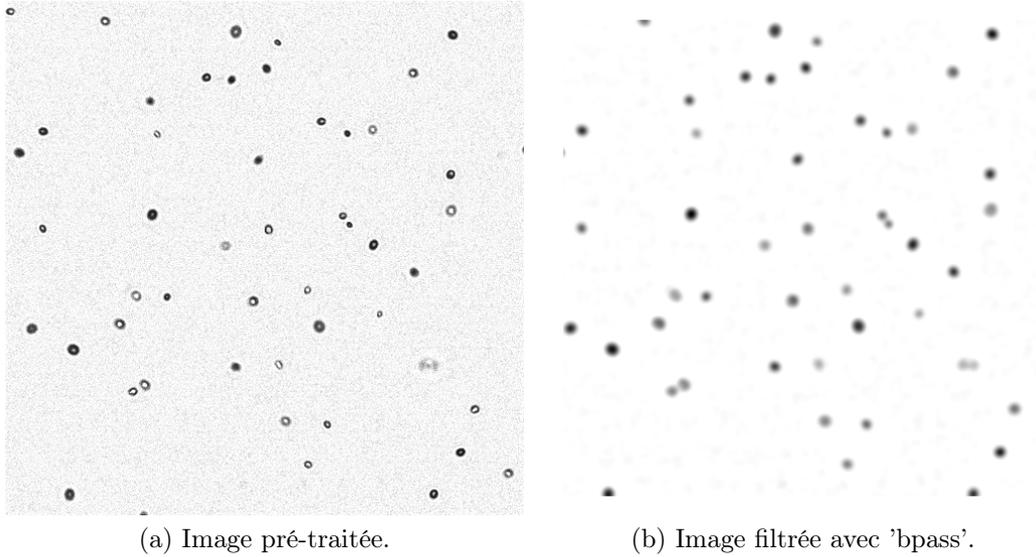
(d) Histogramme des valeurs des pixels de l'image.

FIGURE 6. Image dont on a soustrait l'arrière plan, puis inversée en contraste, et histogrammes des niveaux de gris correspondants. (6a) L'arrière-plan de l'image est éliminé en utilisant la fonction 'subtract background' du logiciel ImageJ avec un rayon de 'rolling ball' choisi de l'ordre de la taille en pixel des images des algues. (6b) Le pic de l'histogramme correspondant au fond de l'image (pixels clairs donc de valeurs de brillance les plus élevées) est maintenant proche de la plus haute valeur de brillance; le fond est presque totalement blanc. Il subsiste un bruit de fond de faible amplitude visible à travers la largeur du pic de luminosité. (6c) L'image est inversée pour obtenir des objets blancs sur fond noir pour la reconstruction de trajectoires. (6d) Le pic de l'histogramme correspond désormais aux pixels de couleur sombre (valeurs de brillance faibles). Pour une meilleure visibilité des images dans ce manuscrit, dans la suite le contraste des images des films présentées ici sera inversé par rapport à celui utilisé lors de l'analyse. Les *Chlamydomonas Reinhardtii* seront donc noires sur fond blanc.

4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS

de chaque pixel par la moyenne de la valeur des pixels situés dans un carré de côté L_o légèrement plus grand que le diamètre caractéristique D_o des objets que l'on souhaite conserver. Il calcule également une image dont on aurait éliminé le bruit de fond haute fréquence, dû par exemple au bruit de pixel de la caméra. Pour calculer cette image 'débruitée', le filtre calcule la convolution d'une gaussienne de largeur à mi-hauteur d_b avec l'image initiale. La convolution avec une gaussienne de même largeur que la longueur d'onde caractéristique du bruit de fond permet de faire disparaître ce dernier. Ensuite, le filtre soustrait la première image qu'il a calculée à la seconde pour donner une image sans bruit de fond et sans arrière-plan. Avant cette étape de filtrage, le diamètre des images des *Chlamydomonas Reinhardtii* D_o mesurait de 9 à 10 μm . Nous avons utilisé pour la création de l'image de l'arrière plan une gaussienne de largeur à mi-hauteur d_b de l'ordre de 2 μm et un carré de côté L_o de 10 à 12 μm pour le calcul de l'arrière-plan. La valeur de d_b que nous avons choisie permet de mettre en forme les images des *Chlamydomonas Reinhardtii* tout en éliminant le bruit de fond haute fréquence. Cette valeur de d_b transforme l'image d'une micro-algue ressemblant à un anneau lumineux, sous la forme d'un objet approximativement gaussien.

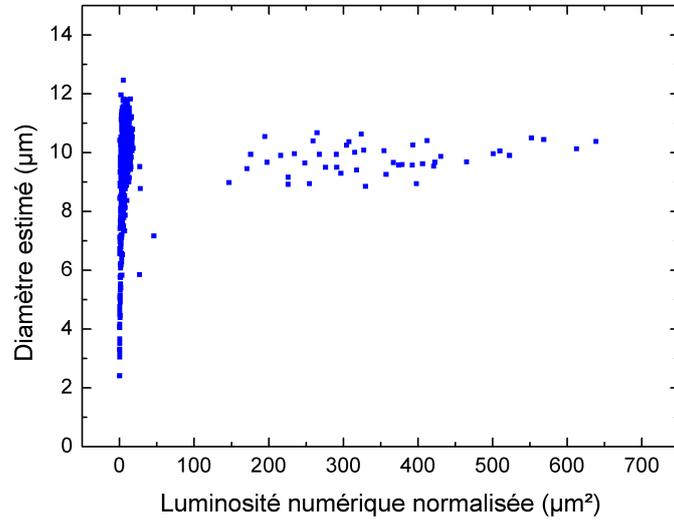
Si l'on fait l'hypothèse que les objets que l'on cherche à détecter ont un profil de brillance ressemblant à une surface gaussienne, les centres des particules à détecter peuvent être définis de manière approximative comme les pixels les plus brillants dans un disque de diamètre de l'ordre de la taille des objets étudiés. Pour détecter ces pixels, la routine 'feature' utilise l'opération de dilatation en échelle de gris. Parmi les opérations de base en mathématiques morphologiques, celle-ci consiste à remplacer la valeur de chaque pixel par la valeur du pixel de niveau de gris le plus élevé situé dans un disque de diamètre D_{max} autour du pixel à modifier. En prenant D_{max} légèrement supérieur au diamètre typique D_o de l'image d'un objet que l'on cherche à détecter, les pixels dont la valeur n'a pas été modifiée par l'opération de dilatation sont 'candidats' à être les centres d'images de *Chlamydomonas Reinhardtii*. On considère dans la suite qu'un 'objet détecté' est l'ensemble des pixels compris dans un disque de diamètre D_{max} autour d'un pixel central détecté. En pratique, nous avons utilisé pour le paramètre D_{max} des valeurs comprises entre 15 et 17 μm suivant la taille des pixels de l'image. Parmi les objets retenus, certains ne correspondent pas réellement à des *Chlamydomonas Reinhardtii*. Pour éliminer ces objets, la routine 'feature' calcule pour chaque objet détecté sa 'luminosité numérique' (somme des valeurs de brillance de tous ses pixels) et son rayon de giration carré (produit de la valeur de brillance de chaque pixel de l'objet, par sa distance au centre de l'objet au carré, sommé sur tous les pixels de l'objet et normalisé par sa luminosité numérique). Il est possible d'éliminer les objets dont la luminosité numérique est faible pour évacuer les objets non désirés (bruit de fond de faible extension spatiale restant par exemple). En effet, la luminosité numérique croît approximativement avec le carré du diamètre en pixels de l'objet. Par conséquent, une *Chlamydomonas Reinhardtii* dont l'image mesurerait 4 pixels de diamètre aurait une luminosité numérique environ 4 fois moins élevée que si son image mesurait 8 pixels de diamètre. Pour établir une luminosité numérique indépendante de la taille des



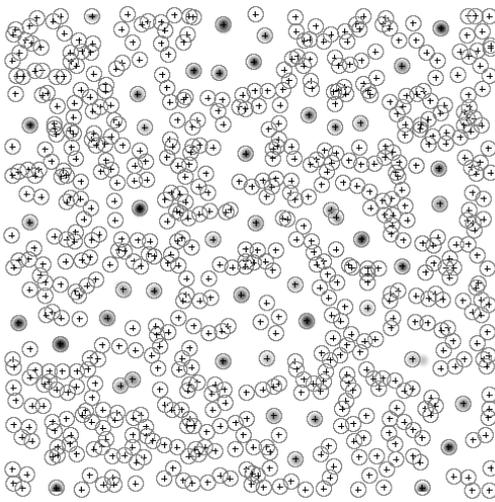
(c) Particules détectées dont la position est signalée sur l'image filtrée par un cercle gris avec une croix noire au centre.

FIGURE 7. Principales étapes de la détection de particules (première partie). (7b) L'image est filtrée par la routine 'bpass' (convolution avec un noyau type 'chapeau mexicain'). (7c) Les objets sont ensuite détectés via la routine 'feature' en utilisant une opération de mathématiques morphologique. Les objets détectés sont entourés par un cercle gris avec une croix noire au centre sur l'image filtrée.

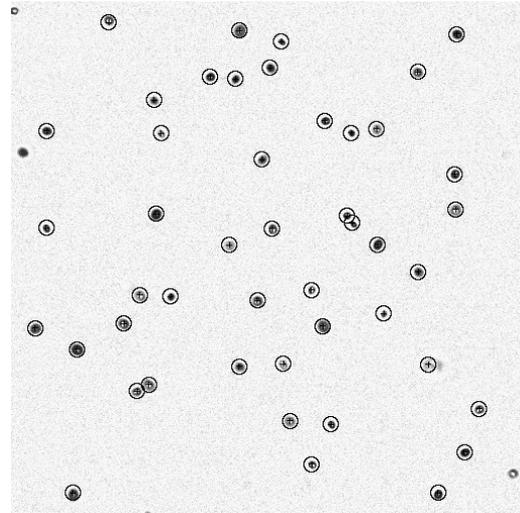
4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS



(a) Diamètre des objets détectés, estimé à partir de leur rayon de giration carré, en fonction de leur luminosité numérique normalisée (LNN) .



(b) Particules détectées dont la position est signalée sur l'image filtrée par un cercle gris avec une croix noire au centre.



(c) Particules de LNN supérieure à $40 \mu\text{m}^2$ représentées sur l'image pré-traitée.

FIGURE 8. Principales étapes de la détection de particules (deuxième partie).

(8a) Diamètre estimé des objets détectés en fonction de leur luminosité numérique normalisée (LNN). (8b) Les objets détectés (cercles gris avec une croix noire au centre) ne représentant pas tous des *Chlamydomonas Reinhardtii*, leur LNN permet d'éliminer les objets non souhaités. (8c) Les objets détectés dont la LNN est supérieure à un certain seuil (ici $40 \mu\text{m}^2$) sont les objets recherchés.

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

pixels de l'image que l'on étudie, on peut définir une luminosité numérique normalisée, comme la luminosité numérique multipliée par le carré de la taille du pixel. Pour s'affranchir de la dépendance de la luminosité en fonction de la valeur maximale de brillance des pixels (ici 255 car les valeurs de brillance de nos images sont codées sur 8 bits), on peut également diviser la luminosité par la valeur maximale de la brillance. Nous avons utilisé une luminosité numérique normalisée de l'ordre de 40 à $80 \mu\text{m}^2$ lors de nos différentes études. Le rayon de giration carré donne un critère supplémentaire pour éliminer des objets qui seraient petits mais très brillants. En pratique nous n'avons pas eu besoin d'utiliser ce filtrage supplémentaire. La routine 'feature' calcule également le degré de déformation (ou 'excentricité') de l'objet ; de 0 pour un disque à 1 pour une ligne. Nous n'avons utilisé ce critère que pour discriminer parmi des objets dont la taille était vraiment importante en pixels (de l'ordre de 30 à 40 pixels de diamètre). Pour des images de *Chlamydomonas Reinhardtii* de diamètre de l'ordre de 7 à 20 pixels, cela n'a pas été nécessaire.

La position d'une particule étant toujours mesurée comme un multiple de la taille du pixel avec cette méthode, la précision de la méthode de mesure présentée est au mieux d'un demi pixel, ce qui n'est pas optimal. Il est possible d'affiner cette position en calculant le barycentre des points d'un objet détecté affectés de leur valeur de brillance. La position de ce barycentre est alors utilisée comme nouvelle position du centre d'un objet détecté. Cette opération de re-centrage peut être effectuée plusieurs fois. Toutefois, il convient d'être prudent lors de la ré-estimation de la position, car si le centre se déplace trop de l'estimation initiale, il est possible qu'elle parvienne à sauter à une autre particule proche. On vérifie que les paramètres utilisés pour la détection des particules donnent bien une précision de détection inférieure au pixel. Pour cela on vérifie que les parts fractionnaires des positions détectées apparaissent à la même fréquence. En effet, si chaque valeur de position détectée sur l'image n'est pas équiprobable, c'est que l'algorithme de détection ne parvient pas à mesurer la position avec une précision meilleure que la taille du pixel.

Même en validant ce critère, la précision de la détection de la position réelle de la particule n'est pas nécessairement sub-pixellique. Comme nous modifions l'image de la particule lors du filtrage avec la routine 'bpass' pour la faire ressembler à une gaussienne, la position du centre de la nouvelle image peut être décalée par rapport à celle de l'image de départ. Pour estimer cette erreur, nous nous sommes servis des trajectoires que nous avons reconstruites. La méthode que nous avons utilisée est exposée au paragraphe suivant.

Les paramètres utilisés lors de la détection des particules sont susceptibles de dépendre de la taille des pixels de l'image que l'on analyse, ces derniers étant directement liés à la taille des pixels de la caméra et au grossissement de l'objectif utilisé. En pratique, la plupart de ces paramètres peuvent être exprimés en micromètres et leur valeur varie peu avec la taille du pixel de l'image tant que la taille des objets étudiés reste plus importante que la taille d'un pixel.

Une fois que les paramètres de détection sont déterminés, le procédé est appliqué à l'ensemble du film et l'on obtient une liste de particules pour chaque image. Il reste à 'connecter' ces positions de particules entre elles pour reconstruire les trajectoires.

4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS

4.3 Connexion des positions successives en trajectoires

Une fois que tous les objets possibles ont été détectés sur toutes les images, il faut connecter les positions de ces objets au cours du temps pour obtenir les trajectoires des micro-nageurs. Il faut reconnaître sur chaque image les objets présents à l'image précédente, ceux qui sont apparus entre temps et ceux qui ont disparu. Soit Δt le temps séparant deux images consécutives. Pour un objet i situé au point \mathbf{x}_i sur une image à l'instant t , il faut déterminer l'objet parmi ceux situés sur l'image suivante à l'instant $t + \Delta t$ qui a le plus de probabilité d'être le même objet. Soit N_t le nombre d'objets que contient l'image au temps t .

On choisit expérimentalement Δt (inverse de la fréquence d'acquisition de la caméra) suffisamment petit pour que chaque objet se soit peu déplacé pendant cet intervalle de temps (il faut au moins qu'il soit possible de suivre à l'oeil le déplacement des particules sans les confondre lorsqu'elles se croisent). On définit Δr_{\max} la distance maximale de laquelle chaque particule a pu se déplacer en un temps Δt . Cette distance doit être supérieure au déplacement physique maximal d'un objet, afin de ne pas « découper » une trajectoire réelle. Elle doit également être inférieure à la moitié de la distance moyenne entre objets, pour empêcher les échanges d'objets lorsque ceux-ci se croisent.

Le critère utilisé pour choisir les connexions représentant le plus fidèlement les déplacements physiques peut être établi par le raisonnement suivant [10]. Considérons une particule se déplaçant dans un plan selon une marche aléatoire avec un coefficient de diffusion D . La probabilité qu'elle ait effectué un déplacement Δx pendant un temps Δt est donnée par :

$$P(\Delta x, \Delta t) \propto \exp\left(-\frac{(\Delta x)^2}{4D\Delta t}\right) \quad (\text{II.5})$$

Si l'on suppose maintenant que N_t particules se déplacent sans interagir avec le même coefficient de diffusion D alors la probabilité que chaque particule i se soit déplacée de Δx_i au bout d'un temps Δt , est donnée par :

$$P(\{\Delta x_i\}_{i=1, \dots, N_t}, \Delta t) \propto \exp\left(-\frac{\sum_{i=1, \dots, N_t} (\Delta x_i)^2}{4D\Delta t}\right) \quad (\text{II.6})$$

Maximiser cette probabilité pour le choix des $\{\Delta x_i\}_{i=1, \dots, N_t}$ est donc équivalent à minimiser $\sum_{i=1, \dots, N_t} (\Delta x_i)^2$.

Ce critère pour la reconstruction des trajectoires est exact pour un système de N_t particules se déplaçant selon une marche aléatoire et sans interactions entre elles mais il est également valide en pratique tant que le temps Δt reste suffisamment petit. La minimisation de cette somme est faite en n'autorisant que des déplacements de particules inférieurs à la distance Δr_{\max} évoquée plus haut. Le paramètre Δr_{\max} est choisi supérieur aux déplacements réels effectués entre deux images (figure 9). La valeur de ce paramètre a été prise entre 1 et 1,5 μm pour une fréquence d'acquisition de 400 images par secondes et entre 8 et 11 μm pour une fréquence d'acquisition de 9 images par secondes.

L'algorithme utilisé pour identifier les positions suivantes de chaque objet fonctionne de la manière suivante. Il détecte des « groupes » d'objets dont les positions pourraient être interchangées d'une image à l'autre. Par exemple, si plusieurs objets sont proches sur une image, il n'est pas évident de déterminer sur l'image suivante quelle position correspond à quel objet. Pour chaque configuration imaginable, l'algorithme calcule la somme des carrés des distances parcourues. La configuration dont la somme est la plus petite est choisie. Si un des objets disparaît d'une image à l'autre (objet qui sortirait de la zone d'observation par exemple), un des objets du « groupe » se retrouve sans position suivante. Dans ce cas là, l'algorithme affecte à l'objet qu'il considère sans position suivante, une valeur de déplacement égale à Δr_{\max} dans le calcul de la somme.

Nous avons évoqué au paragraphe précédent la question de la précision à laquelle nous arrivions pour la mesure de la position des particules. Nous avons estimé l'erreur sur cette quantité de la manière suivante. Nous avons éliminé une partie du bruit de fond des trajectoires en remplaçant les coordonnées des particules à chaque instant t par la moyenne de leurs coordonnées aux instants $t - \Delta t$, t , et $t + \Delta t$. Nous avons mesuré les distances entre chaque position et la position 'moyennée' correspondante, et nous avons mesuré la variance de la distribution de ces distances. L'erreur de détection de position que nous avons obtenue est de l'ordre du demi-pixel, ce qui reste une bonne précision lorsque l'on compare cette valeur aux déplacements typiques des particules qui sont de 5 à 10 pixels entre deux images, suivant l'objectif et la fréquence d'acquisition utilisés (figure 11).

4.4 Filtrage des particules immobiles

Il arrive qu'il reste certaines particules immobiles dans la zone d'observation. Ce peut être des algues mortes qui n'auraient pas été éliminées lors de la phase de décantation de la suspension avant la mise en capillaire ou bien des artefacts n'ayant pas été éliminés par le filtrage.

Nous avons analysé chaque trajectoire reconstruite et éliminé celles pour lesquelles les objets détectés ne se déplaçaient pas au minimum d'une certaine distance Δr_{\min} au cours d'une durée maximum Δt_{\max} (figures 10 et 11). Les paramètres Δr_{\min} et Δt_{\max} ont été choisis en fonction des paramètres caractéristiques de la dynamique des algues.

4.5 Analyse 2D d'un système 3D

Le dispositif optique utilisé donne une image en deux dimensions (2D) de trajectoires d'objets évoluant dans les trois dimensions (3D). Dans la pratique, pour éviter d'obtenir des trajectoires dirigées dans la direction perpendiculaire au plan d'observation (donc des trajectoires dont le déplacement semblerait minime), nous avons conservé uniquement les trajectoires dont la durée était significative dans la zone d'observation. La durée minimale typique d'une trajectoire a été prise à deux secondes environ (suivant la profondeur d'observation). Ainsi, comme la profondeur

4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS

sur laquelle on détecte des objets est faible (de l'ordre de quelques diamètres de cellules), on élimine les trajectoires qui ne seraient pas dirigées « un minimum » dans le plan d'observation.

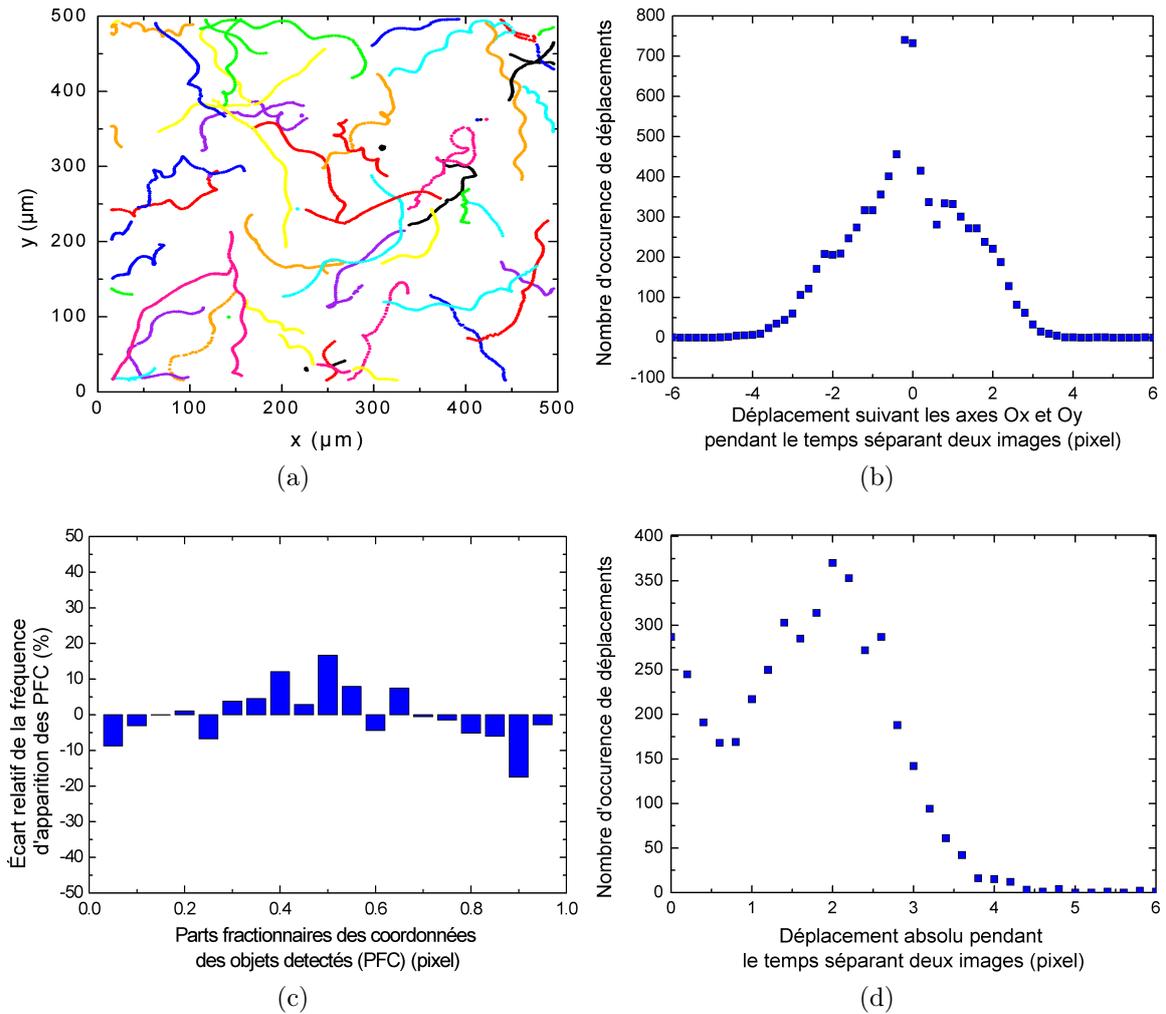
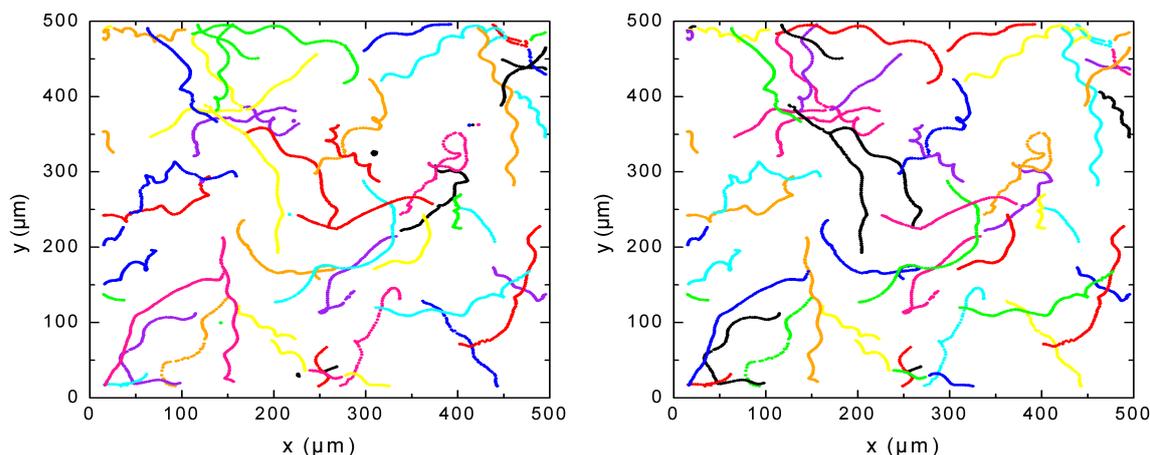


FIGURE 9. Choix de la valeur du paramètre de connexion des positions de trajectoire (Δr_{\max}) et vérification que les paramètres de détection donnent une précision de détection de position inférieure au pixel.

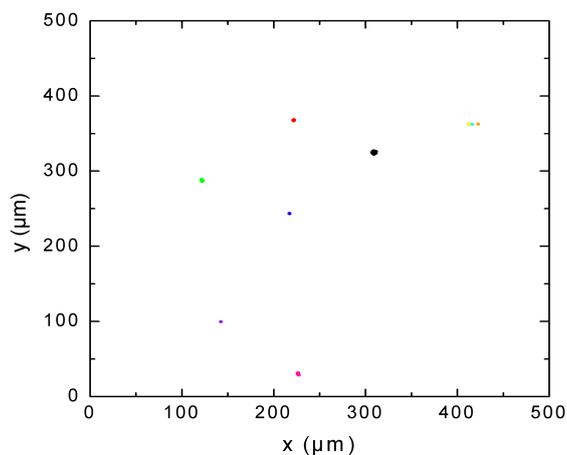
(9a) Trajectoires obtenues avec les paramètres choisis ($\Delta r_{\max} = 6$ pixels). (9b) Histogramme des déplacements en pixels entre deux images dans les directions x et y. (9c) Histogramme des parts fractionnaires des positions détectées. (9d) Histogramme des modules des déplacements en pixels entre deux images consécutives.

4. RECONSTRUCTION DES TRAJECTOIRES DES MICRO-NAGEURS À PARTIR DE FILMS



(a) Trajectoires avant filtrage des immobiles.

(b) Trajectoires après filtrage des immobiles.



(c) Trajectoires éliminées.

FIGURE 10. Choix des valeurs des paramètres de suppression des particules immobiles.

(10a) Trajectoires avant élimination des particules immobiles. (10b) Trajectoires restantes après élimination des particules immobiles. (10c) Trajectoires éliminées car ne remplissant pas les critères de mobilité demandés. Un objet devait se déplacer de 8 pixels ($10 \mu\text{m}$) au moins au cours d'une laps de temps de 14 images (1.6 s) pour être considéré comme mobile. Les objets dont la trajectoire ne vérifie pas ce critère sont éliminés.

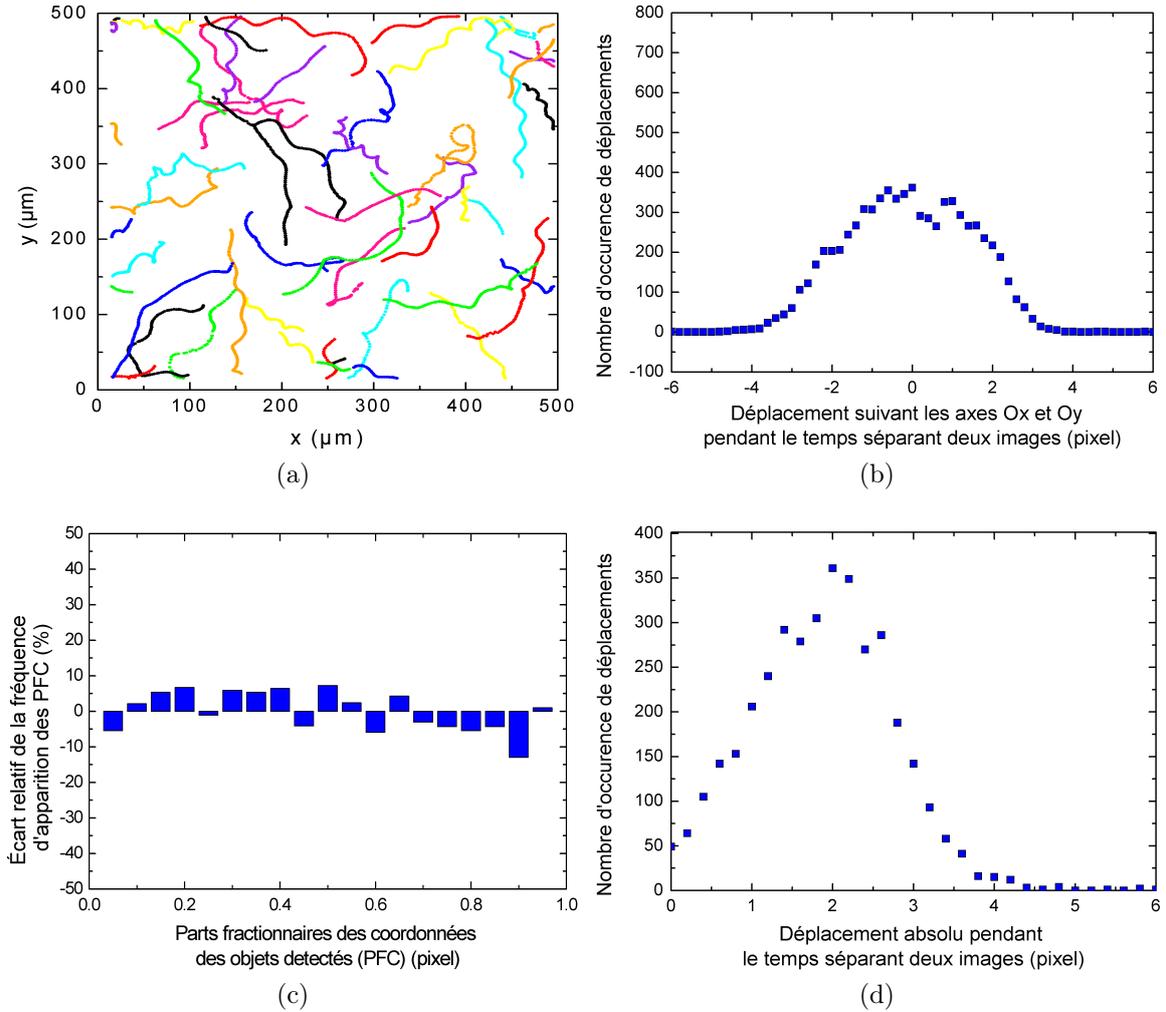


FIGURE 11. Choix des valeurs de paramètre de connexion des positions de trajectoire (Δr_{\max}) et vérification que les paramètres de détection donnent une précision de détection de position inférieure au pixel.

(11a) Trajectoires restantes après élimination des particules 'immobiles'. (11b) Histogramme des déplacements en pixels entre deux images dans les directions x et y. (11c) Analyse de la fréquence de mesure des parts fractionnaires des positions détectées, (11d) Histogramme des déplacements en module en pixels entre deux images. Un déplacement minimal de 8 pixels ($10 \mu\text{m}$) était à réaliser au cours d'une durée maximale de 14 images (1.6 s) pour que l'objet soit considéré comme mobile.

A. COMPOSITION ET PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE TAP

Annexes

A Composition et préparation du milieu de culture TAP

La recette de TAP que nous avons utilisée nous a été fournie par l'IBPC⁷. Le TAP est préparé à partir de quatre solutions mères dont voici la préparation :

- Solution Beijering's 5x :
 - ➔ Les deux parties suivantes sont à préparer séparément
 - ◆ NH_4Cl 36 g
 - ◆ $(\text{MgSO}_4, 2\text{H}_2\text{O})$ 9 g
 - ◆ Compléter à 500 mL avec de l'eau pure

 - ◆ $(\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O})$ 4,5 g
 - ◆ Compléter à 400 mL avec de l'eau pure
 - ➔ Mélanger le tout pour obtenir 900 mL de solution
- Solution Phosphate :
 - ➔ K_2HPO_4 (anhydre) 12,9 g
 - ➔ KH_2PO_4 (anhydre) 6,55 g
 - ➔ Compléter à 900 mL avec de l'eau pure
- Solution Tris acetate :
 - ➔ Tris base 217,8 g
 - ➔ Acide acétique glacial 90 mL
 - ➔ Eau pure 810 mL
- Solution Éléments trace [32] :
 - ➔ Composition :
 - ◆ EDTA- Na_2 50.00 g
 - ◆ H_3BO_3 (Acide Borique) 11.14 g
 - ◆ $(\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O})$ 22.0 g
 - ◆ $(\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O})$ 5.1 g
 - ◆ $(\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O})$ 5.0 g
 - ◆ $(\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O})$ 1.6 g
 - ◆ $(\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O})$ 1.6 g
 - ◆ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g
 - ➔ Préparation :
 - ◆ Ajouter tous les composés sauf l'EDTA, chacun leur tour dans un Erlenmeyer contenant 550 mL d'eau pure milli-Q. Chauffer la solution à approximativement 70 °C.
 - ◆ Dans un autre Erlenmeyer, ajouter l'EDTA à 250 mL d'eau pure milliQ et chauffer jusqu'à dissolution.

7. Cette recette est également disponible sur internet (google : « Janette Kropat TAP recipe 2010 »).

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

- ◆ Ajouter la solution d'EDTA à la solution précédente (et pas l'inverse) et mener le mélange à ébullition.
- ◆ Laisser la solution refroidir jusqu'à une température de 70 – 75 °C.
- ◆ Ajuster le pH de la solution à 6.5 – 6.8 avec du KOH à 20%. La température ne doit pas descendre en dessous de 70 °C ni le pH dépasser 6.8 sinon la solution n'est plus bonne.
- ◆ Compléter avec de l'eau pure à 1000 mL.
- ◆ Couvrir le récipient avec un bouchon de coton (pas de parafilm) et laisser reposer deux semaines jusqu'à ce que la couleur passe de vert à violet sous agitation.
- ◆ Filtrer le précipité rouge-marron et stocker la solution au réfrigérateur. Dans le cas de la présence d'un précipité, vous ne connaîtrez pas la concentration réelle en éléments dans la solution.

Préparation du milieu TAP :

- Mélanger ensemble les solutions suivantes :
 - 10.0 mL de solution Beijering's 5x
 - 8.33 mL de solution Phosphate
 - 10.0 mL de solution Tris-Acetate
 - 1.00 mL de solution Trace
- Compléter avec de l'eau pure milliQ jusqu'à 1000 mL.

B Préparation des boîtes de culture sur milieu solide

Les boîtes servant à la culture en milieu solide sont préparées de la manière suivante. Le gel est réalisé à partir du milieu TAP préparé suivant le protocole de l'annexe II.A. Juste avant la stérilisation du TAP à l'autoclave, on ajoute à la solution 15 g/L d'agar-agar en poudre. Après agitation pour homogénéiser le mélange, on le stérilise à l'autoclave. À la sortie de l'autoclave et avant que le milieu n'ait commencé à gélifier, sous une hotte à flux laminaire on verse le milieu dans des boîtes de Petri stériles de diamètre 57 mm, à raison de 10 mL de solution par boîte. Les boîtes recouvertes par leur couvercle sont laissées à refroidir sous la hotte pendant une heure environ. Les boîtes sont scellées avec du film Parafilm pour minimiser les risques de contamination du milieu gel. Puis ces boîtes sont stockées dans un environnement où il peut y avoir de la lumière afin qu'en cas de contamination, celle-ci soit rapidement détectable à l'oeil nu.

C Calendrier de repiquage des cultures

Les cultures ont été repiquées de la manière suivante. Les cultures en milieu solide (boîtes contenant le milieu TAP additionné d'Agar-Agar) étaient lancées le vendredi matin à 10h. Chaque boîte était utilisée après une semaine d'incubation, le vendredi à 10h pour démarrer une première culture en milieu liquide (première génération)

D. CARACTÉRISTIQUES DES CAMÉRAS UTILISÉES NÉCESSAIRES À L'ANALYSE DES DONNÉES

ainsi qu'une nouvelle boîte. Ensuite une culture liquide (deuxième génération) était initiée après trois jours d'incubation soit le lundi, à partir de la culture liquide de première génération. Cette nouvelle culture était ensuite utilisée le jeudi ou bien le vendredi si la culture n'était pas encore en phase de croissance logarithmique le jeudi.

D Caractéristiques des caméras utilisées nécessaires à l'analyse des données

Voici dans les tableaux II.1 et II.2 les caractéristiques techniques principales des caméras utilisées pour l'analyse des films réalisés.

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Grossissement utilisé	Taille de pixel correspondante (μm)
x40	0.32
x20	0.65
x10	1.29
x4	3.22

TABLE II.1. Taille d'un pixel de caméra Sensicam qe (PCO) en fonction du grossissement. La taille des pixels a été multipliée par un facteur 2 par rapport à la taille de pixel originale car nous avons remplacé chaque groupe de 2x2 pixels par un seul pixel, deux fois plus large et deux fois plus long et dont la valeur était la moyenne des quatres pixels initiaux ('binning' en anglais). Cette opération permet de réduire le temps de réponse de la caméra tout en conservant les dimensions du champ d'observation.

Grossissement utilisé	Taille de pixel correspondante (μm)
x64	0.34

TABLE II.2. Taille d'un pixel de caméra Miro (Photon Lines) en fonction du grossissement utilisé.

Chapitre III

Dynamique de nage individuelle en suspension diluée

Sommaire

1	Mécanisme de nage des <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> . . .	49
1.1	Stratégie de nage à faibles nombres de Reynolds	49
1.2	Mesure de la fréquence moyenne de battement des flagelles des micro-algues	50
1.3	Mesure du module de vitesse moyenné sur un zigzag . . .	55
2	Dynamique de nage aux temps longs devant la durée d'un battement	57
2.1	Mécanisme de nage et marche aléatoire avec persistance .	57
2.2	Mesure du temps de rotation hélicoïdale et du temps de réorientation aléatoire des micro-algues	59
2.3	Mesure de la vitesse balistique	67
3	Modification de la dynamique de nage suivant la visco- sité du fluide porteur	69
3.1	Effet de la viscosité sur le mécanisme de locomotion des micro-algues	69
3.2	Effet de la viscosité sur la marche aléatoire	77
4	En résumé	81

Motivation

Nous allons maintenant analyser la dynamique individuelle de micro-nageurs dans une suspension diluée. Ici les interactions hydrodynamiques entre nageurs sont négligeables. Nous verrons au chapitre suivant comment la présence de voisins dans la suspension peut affecter la nage. La manière dont se déplacent les *Chlamydomonas Reinhardtii* à l'aide de leurs flagelles est complexe (figure 1) et cela entraîne des propriétés statistiques particulières pour la dynamique de nage [19]. Nous présentons dans ce chapitre une étude détaillée de cette nage en microscopie optique.

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

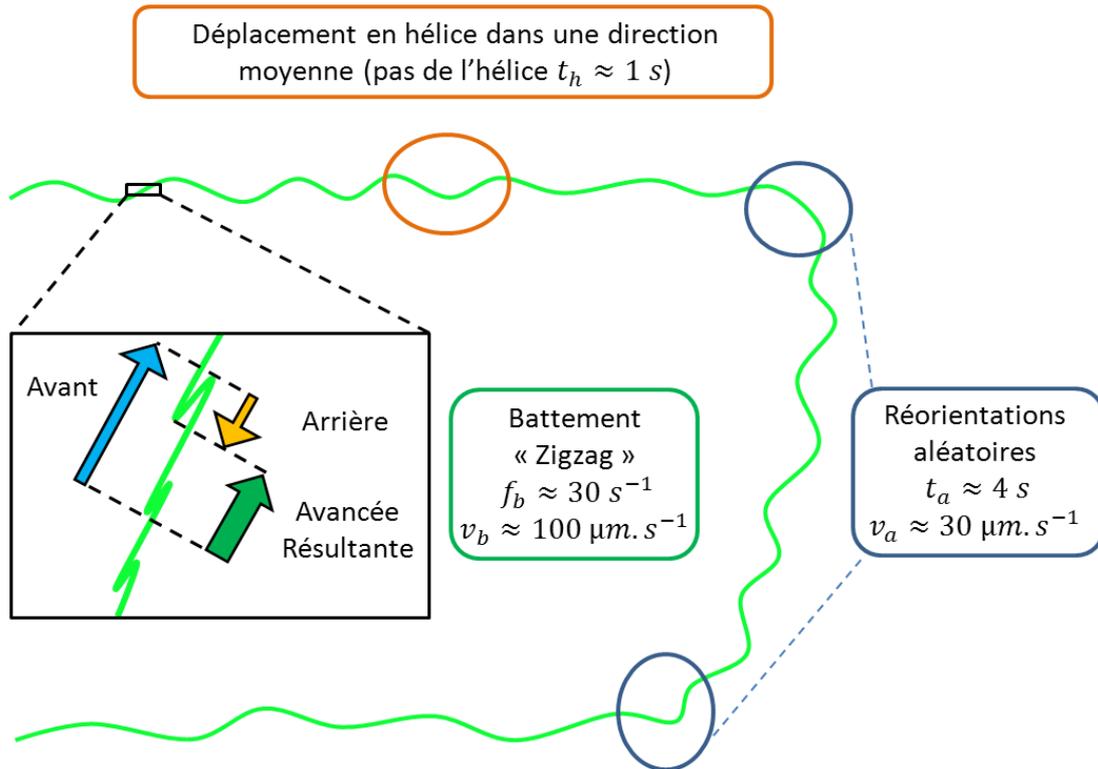


FIGURE 1. Schéma de la nage des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*. Dans la bulle du zoom est représentée la « brique de base » de la nage. Pendant un battement de flagelles, l'algue avance à une vitesse instantanée v_b de l'ordre de $100 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, puis recule (mouvement de « zigzag »). La vitesse moyenne de déplacement qu'elle atteint avec ce type de mouvement est de l'ordre de $30 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Les flagelles battent à une fréquence typique f_b de l'ordre de 30 Hz. Après quelques battements, la trajectoire de la cellule ressemble à une hélice le long d'une direction moyenne. Le temps t_h mis par la cellule pour effectuer une rotation autour de l'axe de l'hélice est de l'ordre d'une seconde. Au bout d'un temps t_a de l'ordre de quelques secondes, la cellule change aléatoirement de direction de déplacement moyenne.

1. MÉCANISME DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

1 Mécanisme de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii*

Nous avons étudié la nage à l'aide d'une caméra rapide (fréquence d'acquisition de 400 Hz). Cela nous a permis de résoudre la dynamique aux temps courts par rapport à la durée d'un battement de flagelles (typiquement 1/30 s).

1.1 Stratégie de nage à faibles nombres de Reynolds

Afin de comprendre comment les algues arrivent à se déplacer dans le fluide qui les entoure, nous pouvons calculer le nombre de Reynolds correspondant à l'écoulement du fluide porteur autour d'elles. Ce nombre sans dimension est le rapport des termes de forces inertielles et des termes de forces visqueuses de l'équation de Navier-Stokes soit :

$$Re = \frac{\rho UL}{\eta} \quad (\text{III.1})$$

Avec ρ et η respectivement la masse volumique et la viscosité dynamique du fluide porteur et U et L respectivement la vitesse et la taille caractéristique de l'écoulement considéré. Dans le cas présent, les cellules de diamètre $\simeq 10 \mu\text{m}$ se déplacent à une vitesse de l'ordre de $50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ dans un milieu aqueux de viscosité dynamique $\simeq 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ et de densité $\simeq 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Cela donne $Re \simeq 5 \cdot 10^{-4} \ll 1$.

Lorsque l'inertie est négligeable, l'équation de Navier-Stokes devient l'équation de Stokes, laquelle est symétrique par renversement du temps. Imaginons un objet se déformant d'une manière réciproque pour se mouvoir. Il déplace le fluide autour de lui lors de la première partie de son mouvement. En faisant exactement le même mouvement dans le sens inverse pour retrouver sa forme initiale, l'objet ramène le fluide exactement à sa configuration de départ. L'objet fait du sur place en moyenne. Ce résultat est connu sous le nom de théorème de Purcell [53] (« scalop theorem » en anglais).

Il existe plusieurs stratégies de nage pour contourner ce problème. Par exemple, les spermatozoïdes propagent le long de leur flagelle des ondes de flexions et les bactéries *Escherichia Coli* font tourner leurs flagelles à la manière de tire-bouchons. Les *Chlamydomonas Reinhardtii* quant à elles nagent une sorte de brasse avec leurs deux flagelles antérieurs (figure 2). Elles balayent le fluide devant elles pendant la première phase de leur mouvement avec leurs flagelles étendus depuis le haut de leur corps vers le bas, ce qui propulse leur corps vers l'avant (figure 2a). Elles ramènent ensuite leurs flagelles le long de leur corps pour les faire revenir à leur configuration initiale [56] (figure 2b). Cette deuxième phase les fait reculer du fait de l'absence d'inertie, mais les flagelles étant proches du corps et principalement orientés parallèlement à la direction du mouvement, la friction qu'ils subissent est moins forte que lors de la phase de poussée, au cours de laquelle les flagelles sont principalement orthogonaux à la direction de déplacement. Ce mécanisme génère une succession de mouvements de marche avant puis marche arrière [58] que l'on appellera dans la suite « zigzag » (figure 3). Comme la distance parcourue en marche avant est plus

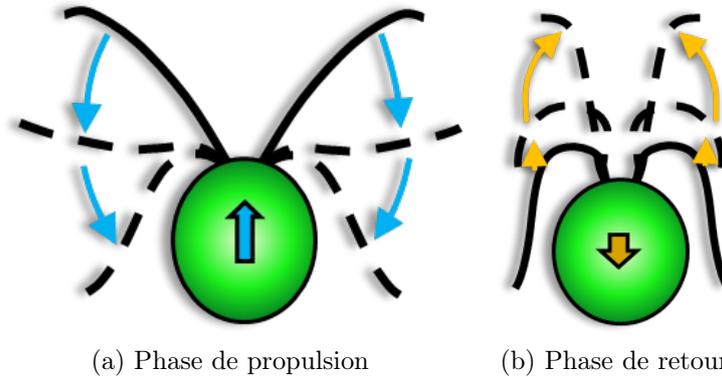


FIGURE 2. Mécanisme de locomotion utilisé par la micro-algue *Chlamydomonas Reinhardtii*. (2a) Phase de propulsion. Les flagelles sont étendus, ils partent du sommet de la cellule et effectuent un mouvement de traction (nageur de type « puller ») sur le fluide en allant vers le bas. (2b) Phase de retour. Les flagelles sont ramenés le long du corps, et se déroulent pour remonter vers l'avant. Les déplacements typiques occasionnés par le mouvement des flagelles dans chacune des phases sont représentés à l'échelle de la cellule par des flèches situées au centre du corps de la cellule. On observe que le déplacement vers l'avant lors de la phase de propulsion est plus important que le recul dû à la phase de retour, assurant un déplacement net vers l'avant.

grande qu'en marche arrière, les cellules finissent par se déplacer vers l'avant.

Nous allons maintenant étudier quantitativement les caractéristiques de ce système de locomotion. La dynamique des algues aux temps courts peut être décrite par la durée de la phase de propulsion et de la phase de retour, et la vitesse instantanée moyenne en marche avant et en marche arrière.

1.2 Mesure de la fréquence moyenne de battement des flagelles des micro-algues

Pour quantifier la fréquence de battement moyenne des flagelles des algues f_b , il suffit de mesurer la durée d'une période de battement et d'en faire la moyenne sur tous les temps et toutes les cellules. Pour cela, il faut détecter le début et la fin d'un battement, soit les moments où la cellule change de sens de déplacement.

1.2.1 Mesure de l'angle de persistance

Pour détecter ce changement d'orientation, nous pouvons étudier l'angle $\theta(\tau)$ duquel a tourné une micro-algue entre les instants t et $t + \tau$ (figure 4). Dans toute la suite, nous appellerons $\theta(\tau)$ angle de persistance car il mesure la persistance de direction. S'il est nul pour tout τ , l'objet étudié se déplace en ligne droite toujours dans le même sens. S'il devient proche de π ou $-\pi$ soudainement, l'objet a changé de sens de déplacement en restant sur le même axe de déplacement. Cet angle de

1. MÉCANISME DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

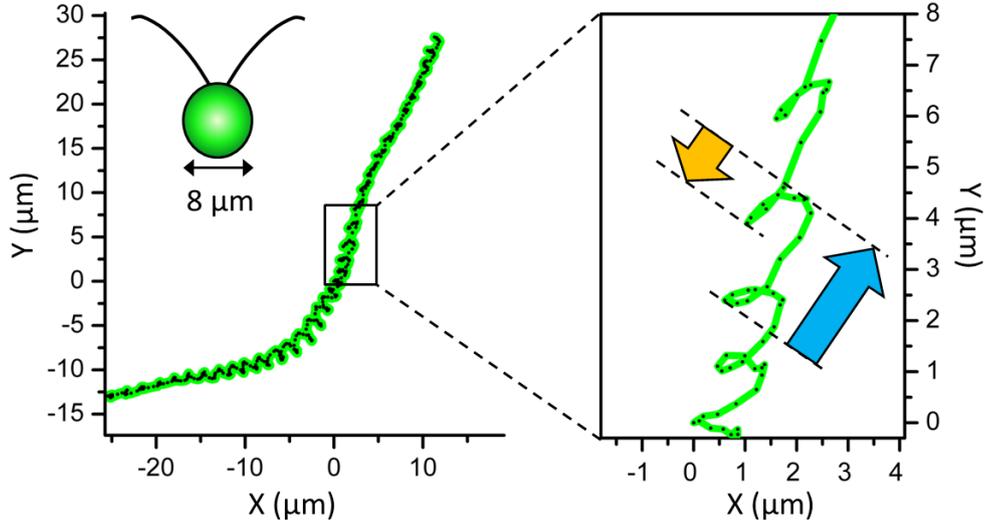


FIGURE 3. Trajectoire d'une *Chlamydomonas Reinhardtii* observée à une échelle de temps inférieure à la durée d'un battement de flagelles. La dynamique en zigzags due à l'absence d'inertie est clairement visible. À droite : détail d'un zigzag. Les flèches représentant les déplacements dans chaque phase sont les mêmes que celle de la figure 2. On notera que la durée de la phase de propulsion (mesurable en nombres de points sur la trajectoire) est similaire à la durée de la phase de retour. Le temps séparant deux points successifs sur la trajectoire est de $1/400$ s. Pour cette trajectoire, la fréquence moyenne de battement des flagelles f_b est de l'ordre de 30 Hz.

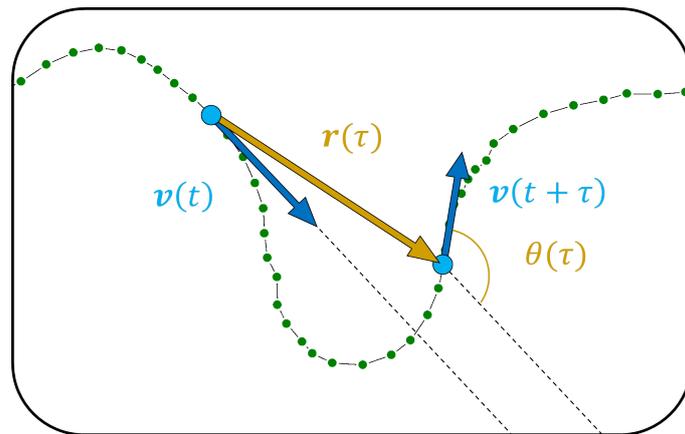


FIGURE 4. Grandeurs mesurées à partir des trajectoires reconstruites dans la caractérisation de la dynamique individuelle. L'angle de persistance $\theta(\tau)$ est l'angle duquel a tourné la cellule entre les instants t et $t + \tau$. Le vecteur déplacement $\mathbf{r}(\tau)$ est utilisé pour le calcul du déplacement quadratique moyen (MSD).

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

persistance peut être défini par :

$$\theta(\tau) = \arccos(\mathbf{e}(t + \tau) \cdot \mathbf{e}(t)) \quad (\text{III.2})$$

avec $\mathbf{e}(t)$ le vecteur unitaire direction de déplacement instantané de l'objet à l'instant t donné par

$$\mathbf{e}(t) = \frac{\mathbf{v}(t)}{|\mathbf{v}(t)|} \quad (\text{III.3})$$

où $\mathbf{v}(t)$ est son vecteur vitesse instantané.

Comme le temps est une variable discrète dans nos mesures, le vecteur vitesse instantané est mesuré en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{OM}(t + \Delta t) - \mathbf{OM}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (\text{III.4})$$

avec $\mathbf{OM}(t)$ le vecteur position de l'objet à l'instant t et Δt le temps séparant deux images consécutives.

1.2.2 Distribution des angles de persistance

L'étude des distributions des angles de persistance $\theta(\tau)$ en fonction du temps τ (figure 5), nous montre qu'entre deux instants séparés par un temps τ court devant le temps moyen de battement des flagelles $1/f_b$, la direction de propagation de la cellule étudiée n'a pas changé pour la plupart des couples d'instant mesurés. Ici la statistique a été calculée à partir d'une cinquantaine de cellules, battant environ chacune deux cent fois de leurs flagelles. Les couples de points séparés de τ appartiennent soit à une phase de marche avant, soit à une phase de marche arrière, très peu sont à cheval sur les deux types de marche. La distribution montre donc un pic centré sur zéro reflétant la persistance de direction.

Pour des temps de l'ordre de la moitié d'une période de battement ($\tau \simeq 1/2f_b$), on observe que le pic central de la distribution a disparu, et que deux pics d'anti-corrélation sont apparus pour les angles de valeur π et $-\pi$. Pour ce temps, la majorité des couples de points sont à cheval sur deux types de marches différentes, la valeur d'angle de persistance correspondante est donc proche de π ou de $-\pi$ (les angles sont mesurés entre $-\pi$ et π).

Lorsque le temps τ devient de l'ordre de la durée d'un battement moyen, alors la majorité des paires de points se retrouvent dans le même type de marche et l'on observe une distribution similaire à celle obtenue pour des temps très courts. Cela traduit le fait qu'entre deux battements, la direction moyenne de déplacement de la cellule a peu varié. Si ce n'était pas le cas, on observerait un élargissement de la distribution par rapport au cas des très petits temps, correspondant à la rotation moyenne qu'effectue une cellule entre deux battements.

La périodicité des fonctions de distributions angulaires reflète donc la fréquence des battements. Cette périodicité doit alors se retrouver aussi dans les moments de cette distribution ou bien encore dans la fonction d'autocorrélation de direction.

1. MÉCANISME DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

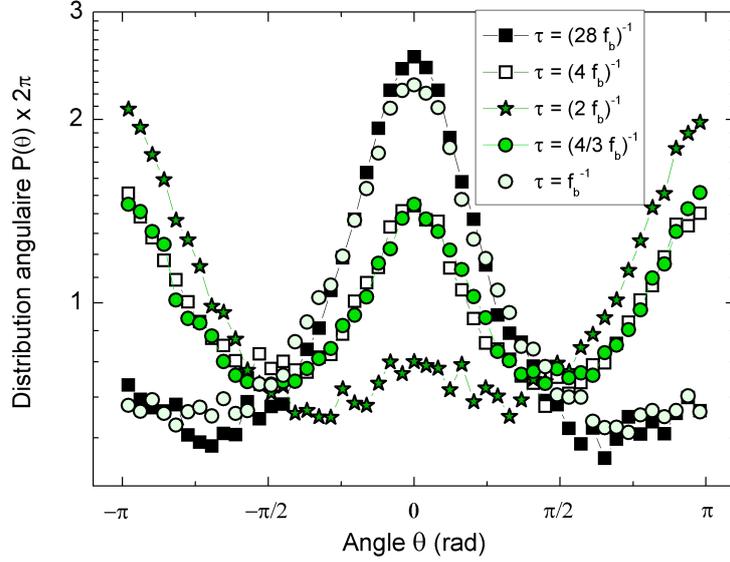


FIGURE 5. Fonctions de distribution de probabilité des angles de persistance aux temps courts devant le temps de battement des flagelles. Temps allant de $\tau = 1/(28f_b)$ à $\tau = 1/f_b$ avec f_b la fréquence de battement moyenne. Le temps $1/f_b$ est le temps le plus court mis par la distribution pour reprendre sa forme initiale.

1.2.3 Fonction d'autocorrélation de direction

Cette fonction est définie par :

$$C(\tau) = \langle \mathbf{e}(t + \tau) \cdot \mathbf{e}(t) \rangle = \langle \cos(\theta(\tau)) \rangle \quad (\text{III.5})$$

avec $\mathbf{e}(t)$ le vecteur direction de déplacement instantané, $\theta(\tau)$ l'angle de persistance duquel a tourné l'objet entre les instants t et $t + \tau$ (grandeurs définies au paragraphe III.1.2.1). Les crochets $\langle \cdot \rangle$ représentent la moyenne temporelle sur tous les temps t et la moyenne d'ensemble sur tous les objets.

Lorsque l'angle $\theta(\tau)$ prend les valeurs $2\pi n$ (les valeurs $2\pi n + 1$) avec n un entier, cette fonction de corrélation présente un maxima à 1 (un minima à -1). Cette grandeur permet de détecter les points dont la direction de déplacement s'est inversée au bout d'un temps τ . Elle permet donc d'obtenir une information sur la durée entre les changements de direction. En mesurant la fonction d'autocorrélation de direction, on observe des oscillations correspondant aux inversions successives du sens de déplacement des algues au cours de leur déplacement (figure 6). On peut obtenir la valeur de la fréquence des oscillations de cette courbe en ajustant le produit d'une fonction exponentielle décroissante $e^{-\tau/t_e}$ et d'une fonction cosinus $\cos(2\pi f_b \tau)$ sur les points expérimentaux obtenus.

La décroissance exponentielle de l'enveloppe de la fonction d'autocorrélation de direction sur un temps t_e traduit deux phénomènes. Elle est provoquée par le changement progressif de direction de déplacement moyen des algues au cours du temps. Chaque battement déplace la cellule vers l'avant dans une direction moyenne et cette direction change légèrement à chaque nouveau battement (figure 3). Le temps

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

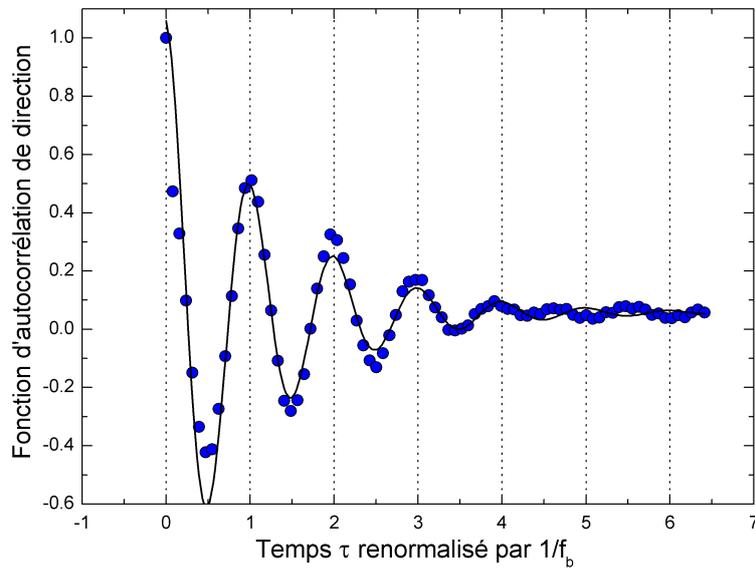


FIGURE 6. Fonction d'autocorrélation de direction. Le temps est en unité de la période des oscillations du signal, qui correspond à la fréquence moyenne de battement de flagelles ($f_b = 31,3$ Hz ici). L'ajustement par la fonction $e^{-\tau/t_e} \cos(2\pi f_b \tau)$ qui a permis d'obtenir la valeur de f_b est superposé sur la figure (ligne noire). La mesure a été réalisée pour une suspension dont le fluide porteur avait une viscosité de $1,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (milieu de culture TAP). À titre indicatif, le temps de décroissance exponentiel de l'enveloppe t_e vaut 38 ms.

1. MÉCANISME DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

t_e est donc lié au temps de corrélation de direction de déplacement moyen. Cette décroissance est également liée au fait que la durée d'un battement de flagelles peut varier au cours du temps pour une cellule, ainsi que d'une cellule à l'autre. Si les algues battaient régulièrement des flagelles et qu'elles nageaient dans une direction fixée, l'amplitude des oscillations de la fonction d'autocorrélation ne décroîtrait pas avec le temps τ . Imaginons maintenant deux cellules se déplaçant dans une direction fixée mais l'une mettant un temps T pour battre une fois de ses flagelles, et l'autre un temps $T + \Delta T$. Les extremums de la fonction d'autocorrélation de direction pour la première algue auraient lieu pour τ multiple de T et ceux de la deuxième algue auraient lieu pour τ multiple de $T + \Delta T$. Si l'on faisait alors la moyenne des fonctions d'autocorrélation des algues, le décalage entre les premiers maxima serait de ΔT . Cela causerait pour la fonction moyenne une diminution de l'amplitude de son premier maxima par rapport aux deux fonctions initiales. Le décalage entre les deuxièmes maxima serait ensuite de $2\Delta T$ et l'amplitude du deuxième pic de la fonction moyenne serait diminué encore plus que celle du premier. Il en serait ainsi de même pour tous les extrema suivants. Le paramètre de temps t_e utilisé pour ajuster l'enveloppe de la fonction d'autocorrélation de direction contient donc le mélange de deux informations différentes : le changement de direction progressif des algues et la variabilité de la durée d'un battement de flagelles.

La partie cosinus de la fonction utilisée pour l'ajustement reflète les oscillations dues aux changements de direction des algues au cours des mouvements de zigzag. On obtient de cet ajustement la valeur de la fréquence de battement caractéristique f_b .

1.3 Mesure du module de vitesse moyenné sur un zigzag

Pour quantifier les déplacements des *Chlamydomonas Reinhardtii*, on peut utiliser le déplacement quadratique moyen (MSD) des cellules $\langle r^2(\tau) \rangle$ (figure 7). On observe que pour un temps inférieur à la durée d'un battement, le MSD est proportionnel au carré du temps. Cela caractérise un premier régime balistique dont la vitesse v_b peut être déduite de la relation :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = v_b^2 \tau^2 \quad (\text{III.6})$$

La vitesse v_b correspond à la moyenne du module de vitesse instantanée au cours d'un seul battement (un zigzag). Il s'agit d'un mélange de la vitesse en marche avant et de la vitesse en marche arrière. Lorsque le temps séparant deux points est très inférieur à la durée d'un battement, la plupart des déplacements mesurés appartiennent à une phase soit de marche avant, soit de marche arrière. La vitesse est donc maximale ainsi que la moyenne des déplacements.

Pour des temps légèrement plus longs, il commence à y avoir dans la statistique des couples de positions séparées par un temps τ dont l'une est située dans une phase de propulsion de la cellule et l'autre est dans une phase de retour. Ainsi la vitesse moyenne entre ces points diminue et la pente du MSD également. La valeur de cette pente est minimale lorsque le temps est proche de la période moyenne de battement. Cela entraîne ainsi un plateau dans le MSD.

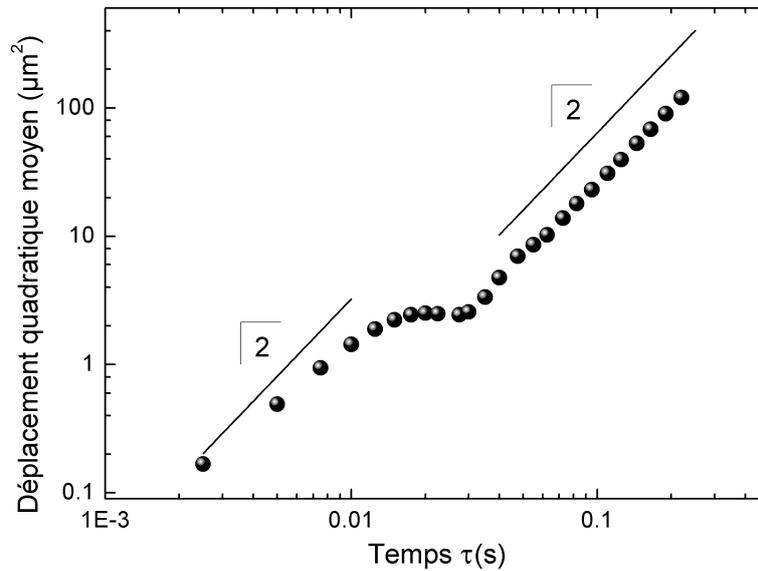


FIGURE 7. Déplacement quadratique moyen (MSD) $\langle r^2(\tau) \rangle$ de micro-nageurs en fonction du temps. Les lignes pleines représentent une pente de 2 en échelle log-log. On observe la présence d'un premier régime balistique lié aux déplacements en ligne droite pendant les phases de poussée et de retour, un plateau dû au temps caractéristique d'oscillation $1/f_b$ et un deuxième régime balistique résultant du déplacement moyenné sur plusieurs cycles de battement. La vitesse v_b caractéristique de la première partie balistique de la courbe est ici de $132 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. La vitesse v_a caractéristique du deuxième régime balistique est de $50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. La mesure a été réalisée pour une suspension dont le fluide porteur avait une viscosité de $1,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (milieu de culture TAP). Le temps caractéristique de battement (mesuré figure 6) $1/f_b$ vaut 32 ms.

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT

Lorsque le temps devient plus grand que la période moyenne de battement, on observe un deuxième régime balistique. Le déplacement à ces échelles de temps est le résultat de plusieurs mouvements de zigzag. Le mécanisme de propulsion est masqué, la cellule progresse en moyenne en ligne droite à une vitesse v_a . On peut déduire cette vitesse de la seconde pente du MSD par la relation :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = v_a^2 \tau^2 \quad (\text{III.7})$$

2 Dynamique de nage aux temps longs devant la durée d'un battement

Nous avons étudié la « brique de base » du mécanisme de locomotion en zigzags des *Chlamydomonas Reinhardtii*. Voyons maintenant comment évoluent ces organismes sur des échelles de temps supérieures à la durée d'un zigzag.

2.1 Mécanisme de nage et marche aléatoire avec persistance

Les trajectoires des *Chlamydomonas Reinhardtii* peuvent être correctement modélisées par une marche aléatoire avec persistance [19, 8, 48, 31, 51]. Les cellules se déplacent dans une direction presque fixée pour une durée de quelques secondes (figure 8). Il s'agit du régime balistique caractérisé par une vitesse v_a et une durée entre deux réorientations aléatoires t_a . Cette vitesse correspond à la vitesse « résultante » de plusieurs mouvements de battements successifs que nous avons évoquée au paragraphe III.1. Au bout de quelques secondes la cellule se réoriente à cause de la désynchronisation temporaire de ses flagelles et perd sa direction de nage initiale [52]. À des échelles de temps supérieures à t_a , les propriétés de dispersion des algues sont celles d'une marche aléatoire simple [54, 19]. Stocker et al. [71] ont découvert que les réorientations aléatoires des algues augmentaient leurs chances d'éviter les prédateurs par rapport à une dynamique de nage purement balistique.

La dynamique des algues à ces échelles de temps comporte une caractéristique supplémentaire. Lors du mouvement de brasse, les deux flagelles ne battent pas exactement de la même manière. Leurs fréquences de battement respectives sont identiques pendant la phase balistique mais la manière dont ils se déploient n'est pas la même pour chaque flagelle [58, 59] (figure 9). Cette dissymétrie entraîne un mouvement de rotation autour de l'axe balistique à une fréquence de l'ordre du Hertz (figure 10). Certaines études suggèrent que ce mécanisme de rotation conjugué à la présence sur le flanc de la cellule d'un œil rudimentaire permettrait à la micro-algue de détecter au mieux la direction vers une source lumineuse. Foster et al. ont comparé cette technique de sonde avec balayage d'un angle conique à celle utilisée par certains radars durant la seconde guerre mondiale [18]. La dynamique de nage hélicoïdale est présente chez un grand nombre de micro-nageurs. L'étude de ce type de mouvement chez les micro-organismes est un champ de recherche actif à ce jour [23, 5].

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

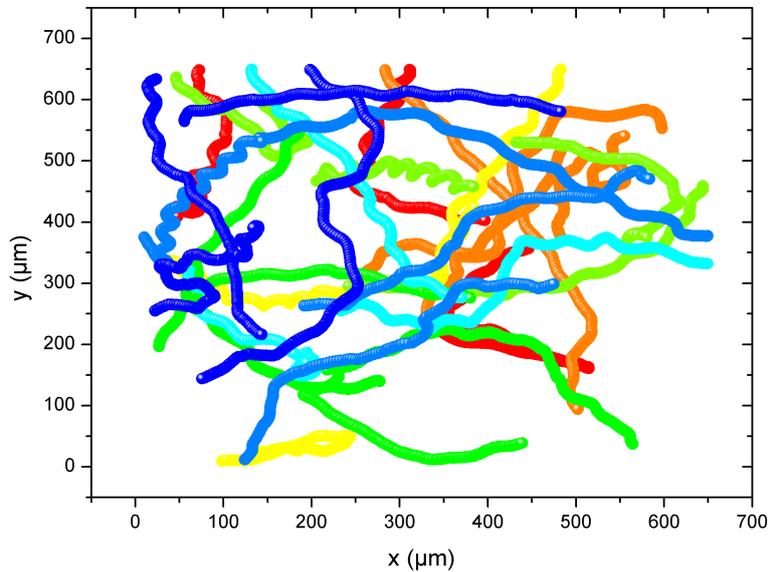


FIGURE 8. Trajectoires typiques de *Chlamydomonas Reinhardtii* observées à une fréquence d'acquisition d'image de 9 images par secondes. La durée des trajectoires représentées a été limitée à 20 secondes. La fraction volumique en cellules est de l'ordre de 0,05 %.

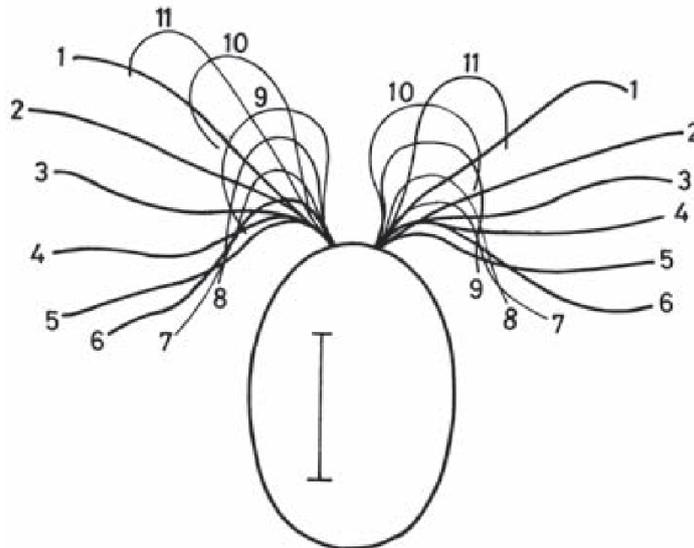


FIGURE 9. Décomposition d'un mouvement de battement d'une *Chlamydomonas Reinhardtii*. Le mouvement de battement n'est pas exactement le même pour les deux flagelles et il y a une composante du mouvement des flagelles hors du plan de la figure (non visible ici), ce qui entraîne un mouvement de rotation hélicoïdal de l'algue. Figure provenant de l'article par Ruffer et Nultsch [58].

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT

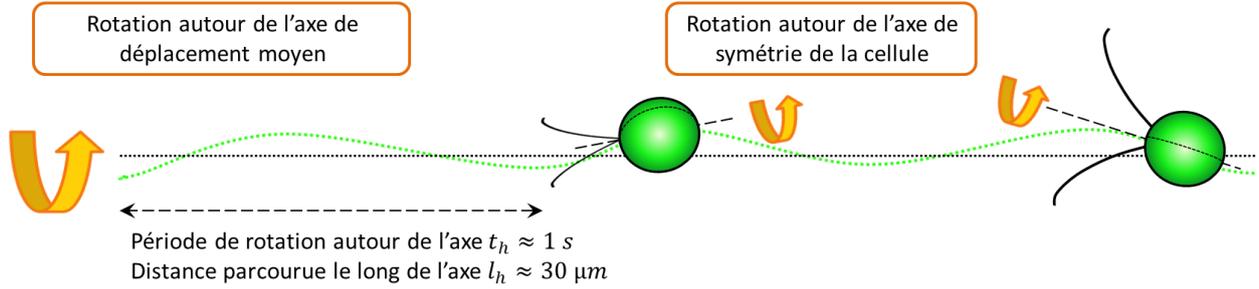


FIGURE 10. Mouvement de déplacement hélicoïdal dû à la dissymétrie entre les deux flagelles au cours du mouvement de brasse. L'algue se déplace en tournant autour d'un axe moyen dont la direction varie peu au cours d'un « run » balistique. Le temps typique de rotation t_h autour de l'axe moyen est de l'ordre de la seconde et la distance l_h parcourue le long de l'axe moyen est de l'ordre de $30 \mu\text{m}$.

Ce mouvement de déplacement hélicoïdal 3D est visible dans les projections 2D des trajectoires que nous reconstruisons (figure 8). Les algues tournent autour de leur axe de déplacement moyen (direction balistique) tout en avançant. Étudions maintenant cette marche aléatoire particulière (figure 11). Pour la décrire quantitativement, nous avons effectué la mesure statistique de différentes quantités d'intérêt (figure 12).

2.2 Mesure du temps de rotation hélicoïdale et du temps de réorientation aléatoire des micro-algues

Pour mesurer la dynamique angulaire, nous pouvons comme lors de l'étude de la dynamique aux temps courts devant la durée d'un battement, utiliser l'angle de persistance $\theta(\tau)$ duquel a tourné un objet entre les instants t et $t + \tau$ (figure 12) :

$$\theta(\tau) = \arccos(\mathbf{e}(t + \tau) \cdot \mathbf{e}(t)) \quad (\text{III.8})$$

avec $\mathbf{e}(t)$ le vecteur unitaire direction de déplacement instantané de l'objet à l'instant t donné par :

$$\mathbf{e}(t) = \frac{\mathbf{v}(t)}{|\mathbf{v}(t)|} \quad (\text{III.9})$$

où $\mathbf{v}(t)$ est le vecteur vitesse instantané. On rappelle que le temps étant une variable discrète dans nos mesures, le vecteur vitesse « instantané » est mesuré en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{OM}(t + \Delta t) - \mathbf{OM}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (\text{III.10})$$

où $\mathbf{OM}(t)$ est le vecteur position de l'objet à l'instant t et Δt est le temps séparant deux images consécutives.

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

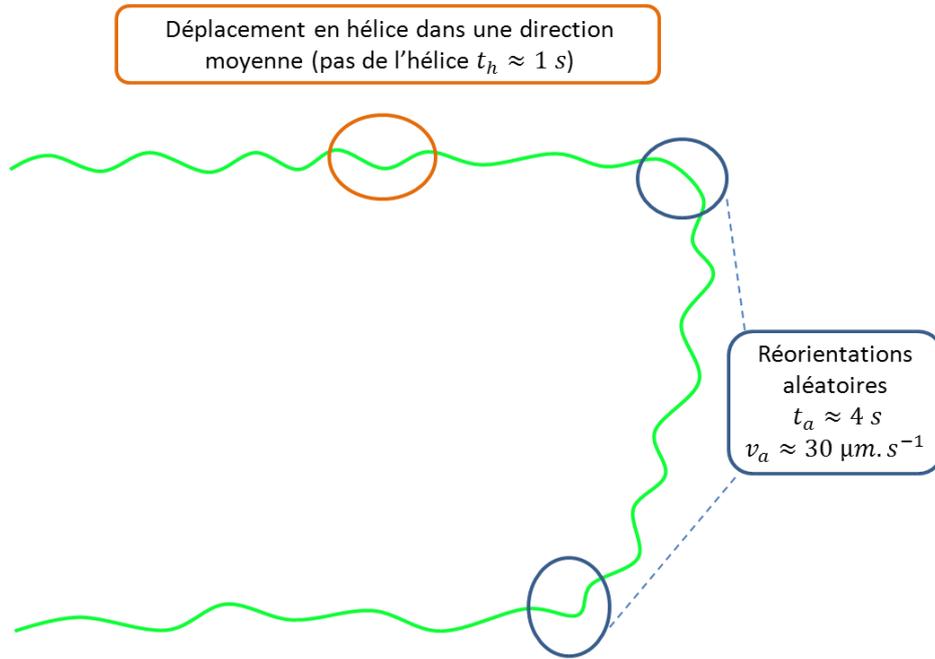


FIGURE 11. Dynamique de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii* en suspension diluée schématisée à une échelle de temps supérieure à la durée d'un battement. La dynamique est composée de phases de déplacements balistiques dans une direction de déplacement moyenne à une vitesse moyenne v_a ponctuées au bout d'un temps moyen t_a , de réorientations aléatoires occasionnées par la désynchronisation momentanée des flagelles. Durant les phases balistiques, les algues suivent un mouvement hélicoïdal le long de la direction moyenne de déplacement. Le temps t_h est la durée d'une rotation autour de l'axe de déplacement moyen.

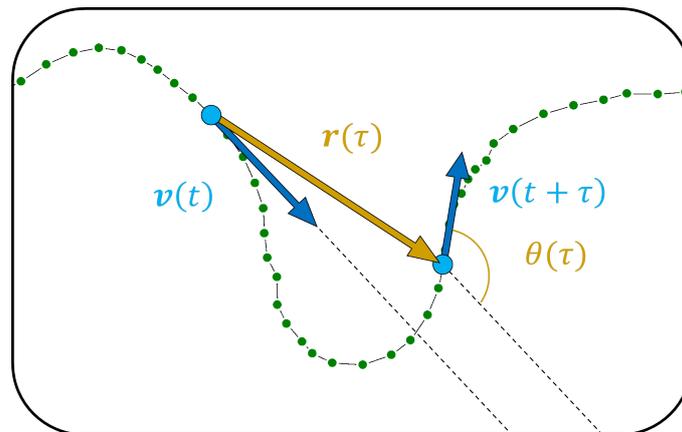


FIGURE 12. Grandeurs mesurées à partir des trajectoires reconstruites pour la quantification de la dynamique individuelle. L'angle de persistance $\theta(\tau)$ est l'angle duquel a tourné la cellule entre les instants t et $t + \tau$. Le vecteur déplacement $\mathbf{r}(\tau)$ est utilisé pour le calcul du déplacement quadratique moyen (MSD).

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT

2.2.1 Distribution des angles de persistance

Dans une marche aléatoire isotrope simple, un marcheur se déplace dans toutes les directions possibles avec la même probabilité et les déplacements sont indépendants entre eux. Pour une marche aléatoire isotrope avec persistance [48, 51], la direction de déplacement à un instant est corrélée avec celles des instants précédents. Pour une marche aléatoire en deux dimensions, l'angle α entre une direction fixe dans le plan de la marche et la direction du marcheur permet de mesurer cette direction. Comme la marche est isotrope, la distribution de probabilité de l'angle d'orientation $P(\alpha, t)$ est uniforme pour tout temps t . La persistance va intervenir à travers la distribution de probabilité conditionnelle $P(\alpha', t'|\alpha, t)$. Cette distribution est la probabilité qu'un marcheur ayant une orientation α à l'instant t , ait une orientation α' à l'instant t' . Cette distribution peut être reformulée en fonction de l'angle $\theta = \alpha' - \alpha$ duquel a tourné la particule après une durée $\tau = t' - t$. Ainsi, elle peut s'écrire $P(\theta, \tau|\alpha, t)$. La condition initiale sera alors $P(\theta, 0|\alpha, t) = \delta(\theta)$. Plus le temps τ sera important et plus l'angle de persistance θ pourra être différent de 0. La distribution de probabilité conditionnelle tendra de plus en plus vers une distribution plate. On peut alors supposer que cette distribution évolue selon l'équation de diffusion suivante [51] :

$$\frac{\partial}{\partial \tau} P(\theta, \tau|\alpha, t) = \frac{1}{t_c} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} P(\theta, \tau|\alpha, t) \quad (\text{III.11})$$

avec t_c le temps caractéristique de perte de la corrélation de direction. la distribution de probabilité de l'angle d'orientation $P(\alpha, t)$ étant uniforme pour tout temps t , la distribution des angles de persistance $P(\theta, \tau)$ suit la même équation d'évolution :

$$\frac{\partial}{\partial \tau} P(\theta, \tau) = \frac{1}{t_c} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} P(\theta, \tau) \quad (\text{III.12})$$

Nous avons mesuré expérimentalement la distribution de probabilité de l'angle de persistance θ en fonction du temps τ séparant deux positions (figure 13). Nous avons effectué cette mesure sur un échantillon de plusieurs milliers de trajectoires de nageurs, dont la durée moyenne est de l'ordre de 10 secondes. On observe que pour des temps τ inférieurs à la seconde, la distribution présente un pic centré sur zéro, caractérisant la persistance directionnelle. Lorsque le temps augmente, la distribution angulaire s'élargit. À partir d'un temps τ de l'ordre d'une seconde, la distribution cesse pratiquement d'évoluer jusqu'à un temps τ de l'ordre de 2 s (courbes représentées en insert sur la figure 13). Ensuite, la distribution recommence à s'élargir jusqu'à ce qu'au bout de quelques secondes, tous les angles deviennent équiprobables. Pour quantifier cette décorrélation plus précisément, on peut étudier comme au paragraphe III.1.2.3, la fonction d'autocorrélation de direction.

2.2.2 Fonction d'autocorrélation de direction

Rappelons la définition de cette fonction :

$$C(\tau) = \langle \mathbf{e}(t + \tau) \cdot \mathbf{e}(t) \rangle = \langle \cos(\theta(\tau)) \rangle \quad (\text{III.13})$$

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

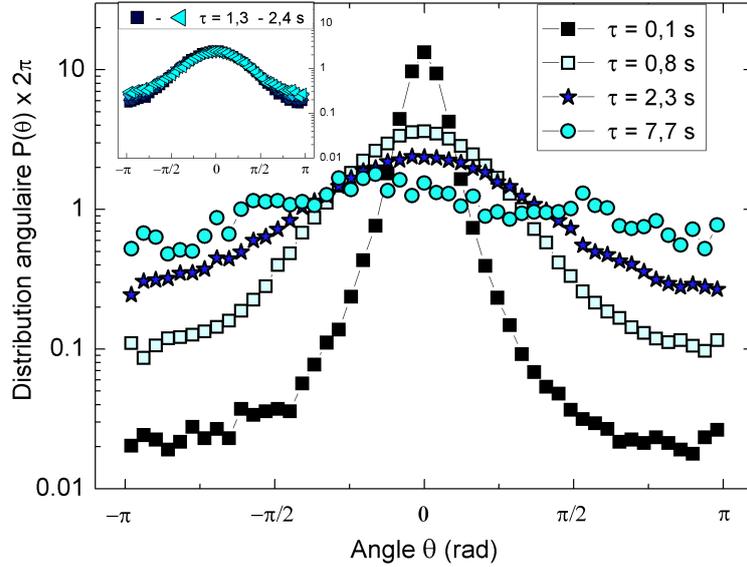


FIGURE 13. Histogramme des angles de persistance θ pour des temps τ allant de 0,1 sec à 7,7 sec. La distribution s'élargit lorsque τ augmente jusqu'à devenir uniforme. Entre $\tau \simeq 1,3$ s et $\tau \simeq 2,4$ s, la distribution ralentit fortement son évolution (courbes représentées en insert). La viscosité du milieu est ici de 2,4 mPa · s.

avec $\mathbf{e}(t)$ et $\theta(\tau)$ définis au paragraphe précédent et $\langle \cdot \rangle$ la moyenne temporelle sur tous les temps t et la moyenne d'ensemble sur tous les objets. Pour un mouvement balistique, cette fonction vaut 1 pour tout temps. Dans une marche aléatoire simple, la direction de déplacement est indépendante de celle des instants qui la précèdent. Ainsi, $C(\tau)$ est toujours nulle puisque chaque déplacement est décorrélé des précédents. Pour une marche aléatoire isotrope avec persistance, on peut utiliser la solution de l'équation III.12 donnée par Peruani et al. [51] pour estimer la dépendance de la fonction d'autocorrélation de direction en fonction de la durée τ :

$$\langle \cos(\theta(\tau)) \rangle \propto e^{-\tau/t_c} \quad (\text{III.14})$$

Appliquons maintenant les résultats de ce modèle à la nage des micro-algues.

2.2.3 Particularité de la dynamique : mouvement hélicoïdal

Nous avons vu que les *Chlamydomonas Reinhardtii* évoluent selon une marche aléatoire avec persistance pour des échelles de temps supérieures à la durée d'une rotation hélicoïdale. En revanche, pour des temps de l'ordre de cette durée, la nage décrit une trajectoire en forme d'hélice. Pour ce type de dynamique, il n'est pas immédiat que l'évolution de la distribution des angles de persistance puisse être décrite par une équation de diffusion. Comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, cette distribution est piquée autour de la valeur $\theta = 0$ pour $\tau = 0$ puis elle s'élargit ensuite lorsque τ augmente (figure 13). Mais lorsque τ se rapproche de la durée d'une rotation de l'hélice, la distribution ralentit son étalement et se « fige ». L'étalement initial de la distribution se comprend en étudiant l'évolution de l'angle

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT

θ entre une orientation initiale d'un nageur et son orientation un instant τ plus tard, pour un temps τ allant de 0 à la durée d'une rotation de l'hélice (figure 14). L'amplitude de l'angle θ augmente avec τ , atteint un maximum puis diminue, atteint un autre extremum puis diminue pour redevenir nulle lorsque la cellule a fait exactement une rotation autour de son axe de déplacement moyen. Après une rotation hélicoïdale, le nageur a retrouvé sa direction de déplacement initiale. La probabilité qu'un nageur retrouve une orientation identique ($\theta = 0$) au bout d'un temps τ égal à la durée d'une rotation, doit donc être plus importante que pour des durées τ inférieures. C'est pour cela que la distribution ralentit son étalement à l'approche de cette valeur particulière de τ . On peut faire l'hypothèse que la fonction $P(\theta, \tau)$ suit une évolution de type diffusif pendant une durée τ inférieure à la moitié de la période moyenne de l'hélice d'une trajectoire. Alors, la fonction d'autocorrélation de direction $\langle \cos(\theta(\tau)) \rangle$ peut être décrite par une fonction exponentielle décroissante avec un temps caractéristique de la rotation hélicoïdal t_h , pour τ inférieur à la demi-période de rotation de l'hélice.

Pour τ supérieur au temps de rotation de l'hélice, la fonction de corrélation pourra en principe être de nouveau décrite par une fonction exponentielle décroissante puisque la distribution $P(\theta, \tau)$ a de nouveau une évolution de type diffusif due aux réorientations aléatoires. Pour mieux appréhender la dynamique dans cette gamme de temps, il est intéressant d'étudier l'évolution de la fonction de corrélation que l'on obtient pour une seule trajectoire (figure 15). On observe des oscillations qui reflètent le caractère hélicoïdal de la trajectoire projetée en 2D. Lorsque l'on calcule la fonction d'autocorrélation de direction pour toutes les trajectoires, ces oscillations disparaissent (figure 16). La tendance moyenne de la fonction d'autocorrélation de direction va être mesurée pour des temps τ supérieurs à t_h . Cette tendance sera donc très affectée par les réorientations aléatoires. Les valeurs des angles entre directions de déplacement moyennes successives vont donc être reflétées par la fonction $C(\tau)$. La tendance des fonctions de corrélation de chaque algue peut donc varier beaucoup d'une trajectoire d'algue à l'autre puisque l'angle duquel elles auront tourné peut varier beaucoup. Par exemple, sur la trajectoire de la figure 15 on peut distinguer deux directions de déplacement moyennes au cours de la trajectoire. Au départ l'algue se déplace approximativement horizontalement vers la droite puis après un temps de l'ordre de 6 à 7 t_h , sa direction de déplacement moyenne est approximativement verticale vers le haut. Elle a donc effectué une rotation moyenne d'environ $\pi/2$ radian. Le déplacement dans chacune des directions dure approximativement 6 à 7 t_h . La valeur de $C(\tau)$ correspondant à cette valeur de τ , est environ de $0 = \cos(\pi/2)$. La valeur absolue de l'angle moyen entre chaque couple d'orientations séparé de 6 à 7 t_h est donc d'environ $\pi/2$, qui est l'angle que font les deux directions de déplacement moyenne de cette trajectoire. Si cet angle avait été différent, la fonction d'autocorrélation de direction l'aurait été également. Pour chaque trajectoire, l'angle entre les directions de déplacement moyennes successives peut prendre toutes les valeurs possibles. Ainsi la manière dont va décroître chaque fonction d'autocorrélation de direction lui sera propre. La fonction d'autocorrélation de direction de toutes les trajectoires sera donc la moyenne de toutes ces fonctions de tendances différentes.

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN
SUSPENSION DILUÉE

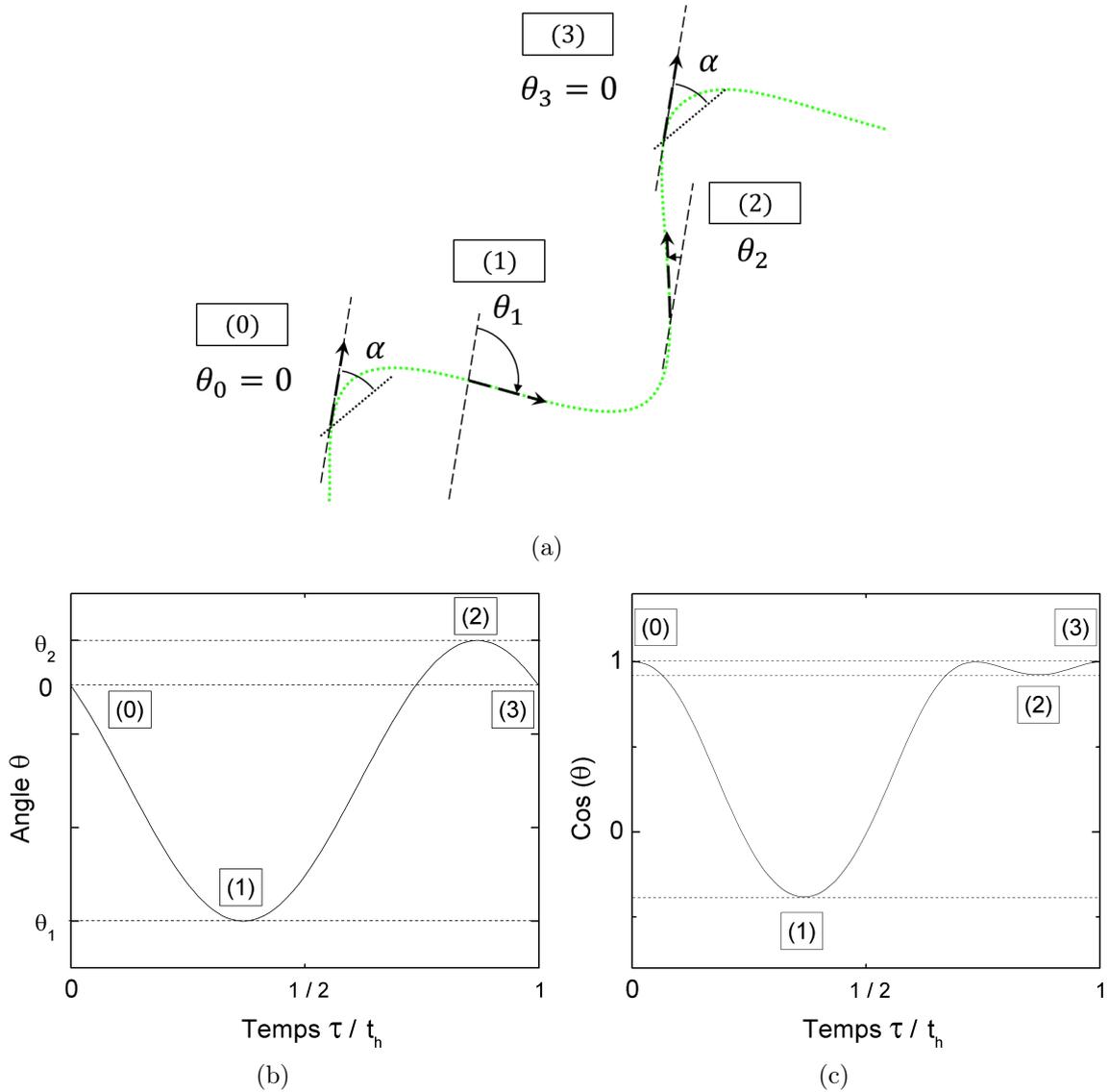
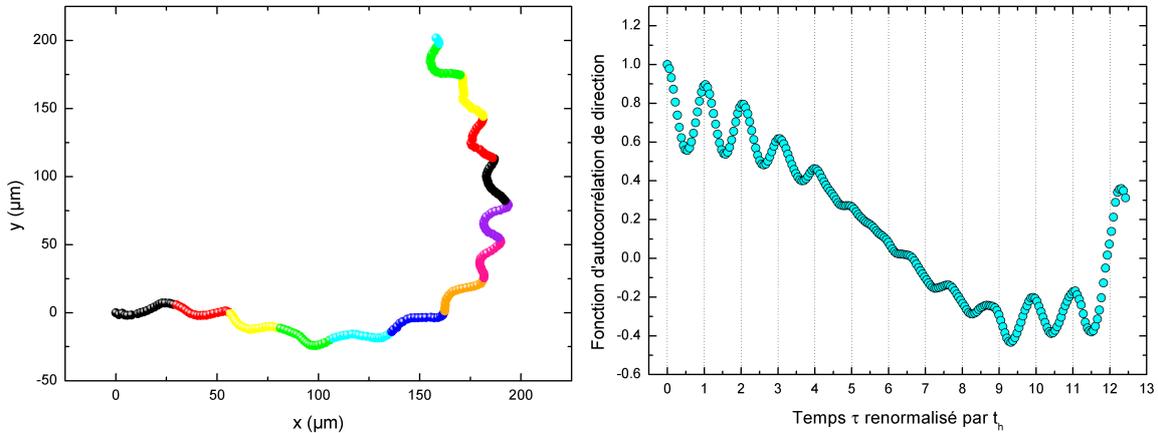


FIGURE 14. Représentation du mouvement de déplacement lors d'une rotation de l'hélice, variation de l'angle de persistance θ avec τ et variation correspondante de $\cos(\theta)$. (a) Détail d'une rotation de l'hélice, angle d'orientation initial α et angle de persistance θ . (b) Évolution de θ au cours d'une rotation de l'hélice. (c) Évolution de $\cos(\theta)$. Les chiffres encadrés correspondent à quatre instants de la trajectoire. (0) est la position initiale du nageur d'orientation α , (1) correspond à l'angle de persistance θ minimal atteint par rapport à α , (2) correspond à l'angle de persistance θ maximal et (3) est le moment où le marcheur a effectué exactement une rotation de l'hélice et a retrouvé son orientation de départ. Le temps t_h est le temps de rotation hélicoïdal.

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT



(a) Trajectoire d'une cellule. La couleur change toutes les t_h secondes ($t_h = 2,0$ s). (b) Fonction d'autocorrélation de direction de la trajectoire.

FIGURE 15. Conséquence du mouvement hélicoïdal sur la fonction d'autocorrélation de direction d'une seule trajectoire. Les oscillations dues à la projection du mouvement hélicoïdal en 2D de la trajectoire sont transmises à la fonction d'autocorrélation. Le temps est en unité du premier temps de corrélation $t_h = 2,0$ s mesuré à partir de la première partie décroissant exponentiellement de la fonction d'autocorrélation de direction de toutes les trajectoires).

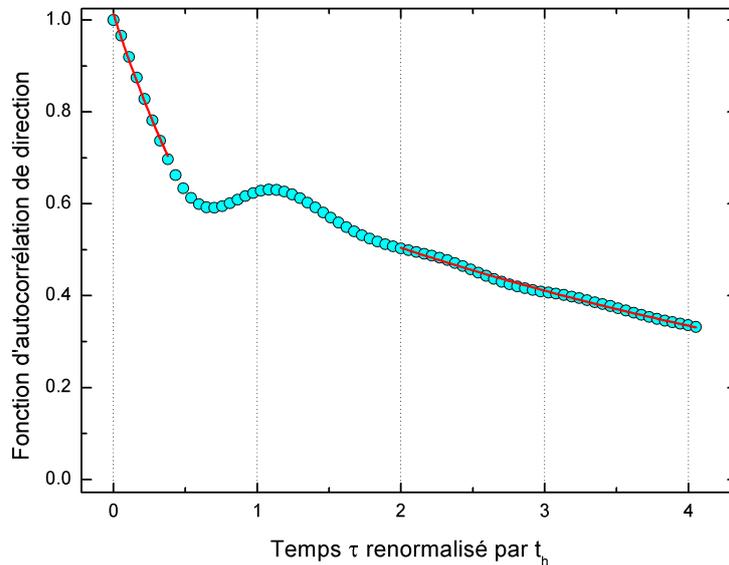


FIGURE 16. Fonction d'autocorrélation de direction $C(\tau)$ calculée sur un millier de trajectoires. Sur la figure, le temps τ est renormalisé par le temps caractéristique t_h . Les oscillations observées dans le cas d'une seule trajectoire sur la figure 15 ont disparues. Au lieu de cela, la fonction d'autocorrélation présente deux régimes : une première décroissance exponentielle, puis un plateau, puis une deuxième décroissance exponentielle. Le temps t_h est le temps extrait de la première partie exponentielle décroissante de $C(\tau)$ par ajustement. Ici, $t_h = 2,0$ s. La fonction $\exp(-\tau/t_h)$ est représentée sur la première partie décroissante (ligne pleine).

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

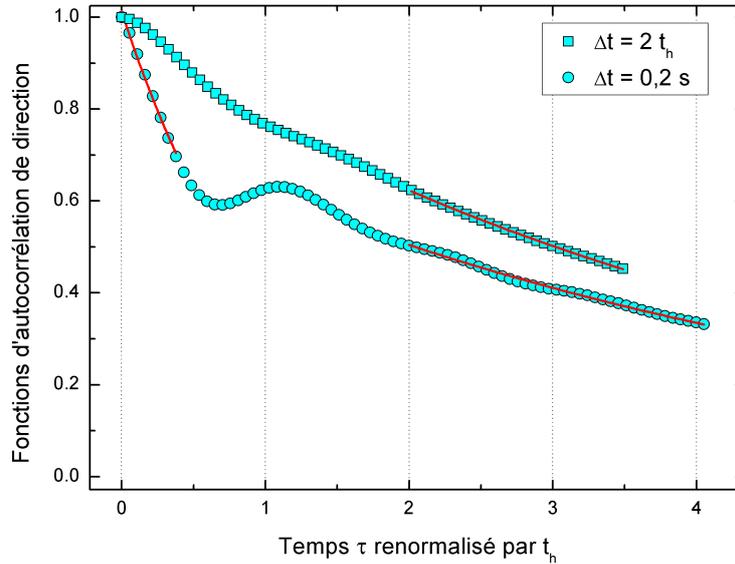


FIGURE 17. Fonctions d'autocorrélation de direction calculées à partir de la direction de déplacement instantanée et de la direction de déplacement moyenne sur un temps $2t_h$. La courbe du haut est mesurée en utilisant une direction de déplacement moyenne entre deux points séparés par un temps $\Delta t = 2t_h$. La courbe du bas est celle de la figure 16, la direction de déplacement instantanée est calculée avec un temps entre deux points égal à $\Delta t = 0,2$ s. Ici le temps t_h vaut $2,0$ s. Le palier observé sur la courbe du bas a disparu sur celle du haut. Le temps de corrélation mesuré ici par ajustement de $C(\tau)$ avec une exponentielle décroissante à partir du temps $\tau = 2t_h$ vaut $t_a = 7,3$ s.

La décroissance moyenne donnera donc le temps caractéristique de changement de direction moyenne des algues.

La mesure du temps caractéristique de réorientation aléatoire t_a se fait alors en utilisant une fonction exponentielle décroissante comme le prévoit le modèle de marche aléatoire avec persistance, dans la gamme de temps τ supérieur à t_h . Pour réaliser l'ajustement, il est nécessaire d'utiliser un coefficient d'ajustement multiplicatif constant a inférieur à l'unité. Ce coefficient sert à prendre en compte le « bruit haute fréquence » généré par les oscillations d'orientation instantanée dues aux rotations hélicoïdales autour de la direction de déplacement moyenne. Il est possible de vérifier la justesse de cette méthode utilisant un coefficient constant, en modifiant la fonction de corrélation de direction pour « masquer » le mouvement de rotation hélicoïdale. Jusqu'à maintenant, pour le calcul de la fonction $C(\tau)$, nous utilisons la direction de déplacement instantané de la cellule. Si au lieu de cela, on utilise une direction de déplacement calculée entre deux points séparés par un temps τ supérieur à la durée de l'hélice t_h , les oscillations rapides dues aux rotations hélicoïdales ne sont presque plus visibles (figure 17). On mesure le temps de réorientation aléatoire des cellules t_a en ajustant sur les points expérimentaux une fonction exponentielle décroissante à partir du temps choisi pour calculer la direc-

2. DYNAMIQUE DE NAGE AUX TEMPS LONGS DEVANT LA DURÉE D'UN BATTEMENT

tion de déplacement moyenne. Les angles calculés pour des temps τ plus courts sont corrélés par construction de la direction moyenne de déplacement. On n'utilise pas de coefficient d'ajustement a . Les résultats obtenus par cette méthode pour le temps t_a sont similaires aux résultats obtenus avec la méthode du coefficient d'ajustement et la direction de déplacement instantané.

Une remarque peut être faite ici. Nous avons tenu compte de la dynamique hélicoïdale qui perturbait la mesure du temps de réorientation aléatoire t_a , mais nous n'avons pas évoqué la possible perturbation de la mesure du temps de rotation hélicoïdale t_h par la dynamique en zigzags que nous avons décrite auparavant. Dans cette étude, le bruit induit par la présence des zigzags est négligeable. La fréquence de battement des algues étant de l'ordre de 30 Hz, elle a un effet assez limité sur une trajectoire mesurée à l'aide d'une caméra de fréquence d'acquisition 10 Hz. Si la fréquence de battement des flagelles était plus faible, il faudrait pour mesurer t_h utiliser une méthode similaire à celle employée pour mesurer t_a .

Nous avons déterminé deux temps caractéristiques de la dynamique de nage aux temps grands devant la durée d'un battement en suspension diluée, le temps de rotation hélicoïdale t_h et le temps de réorientation aléatoire des algues t_a . Ces deux temps sont mesurables à partir de la fonction d'autocorrélation de direction de déplacement instantané : à partir de la première partie décroissant exponentiellement pour le temps de rotation hélicoïdale t_h et à partir de la deuxième pour le temps de réorientation aléatoire t_a . Passons maintenant à la mesure du dernier paramètre de la dynamique : la vitesse balistique entre deux réorientations aléatoires.

2.3 Mesure de la vitesse balistique

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la dynamique de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii* peut être décrite comme une marche aléatoire avec persistance caractérisée par un régime balistique avec une vitesse moyenne v_a (figure 11). Pendant ce régime, la cellule tourne autour de son axe de déplacement balistique à raison d'un tour toutes les t_h secondes. Au bout d'un temps moyen t_a survient un processus de réorientation aléatoire dû à une désynchronisation temporaire des flagelles des algues.

Comme lors de l'étude de la dynamique aux échelles de temps proches de la durée d'un battement de flagelles, nous pouvons étudier le déplacement quadratique moyen des cellules (MSD) pour déterminer la vitesse caractéristique de cette dynamique. Pour ce type de comportement, le MSD $\langle r^2(\tau) \rangle$ est linéaire pour des temps longs devant t_a et quadratique pour des temps plus courts [43, 54, 19] (figure 18). Le modèle de marche aléatoire avec persistance donne l'expression suivante pour le déplacement quadratique moyen, avec t_a le temps entre deux réorientations aléatoires et v_a la vitesse moyenne entre ces changements de direction [51, 8, 48] :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = (v_a t_a)^2 \left(\frac{\tau}{t_a} - \frac{1}{2} [1 - e^{-2\tau/t_a}] \right) \quad (\text{III.15})$$

On retrouve bien aux temps longs une marche aléatoire avec :

$$\langle r^2(\tau) \rangle \sim (v_a^2 t_a) \tau \quad (\text{III.16})$$

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

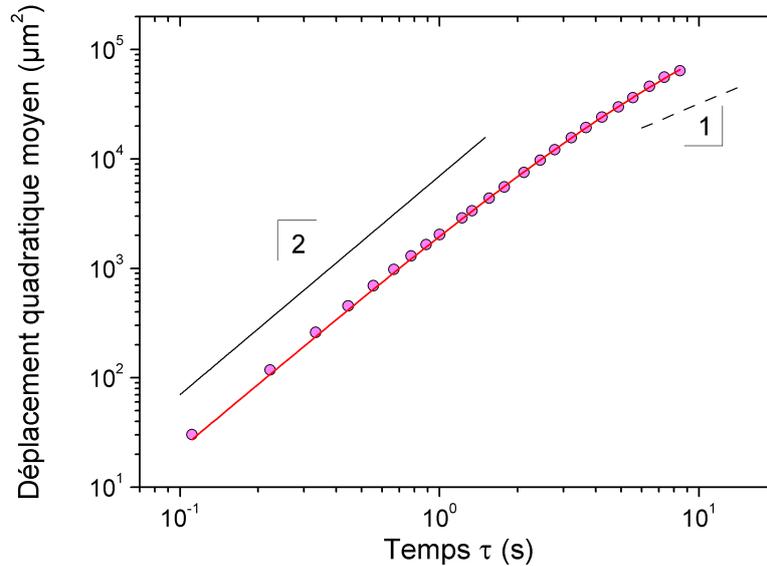


FIGURE 18. Déplacement quadratique moyen des cellules $\langle r^2(\tau) \rangle$ pour des temps τ grands devant la durée d'un battement de flagelles. La ligne pleine représente une pente de 2 en échelle log-log et la ligne pointillée une pente de 1. La ligne superposée aux points expérimentaux est un ajustement par la fonction III.15. Ici $v_a = 47,3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ et $t_a = 4,8 \text{ s}$.

et un régime balistique aux temps courts :

$$\langle r^2(\tau) \rangle \sim v_a^2 \tau^2 \quad (\text{III.17})$$

On obtient v_a en ajustant sur les valeurs de MSD mesurées, la fonction donnée dans l'équation III.15 avec pour valeur du paramètre t_a le temps de réorientation aléatoire obtenu par la fonction d'autocorrélation de direction.

Il est intéressant de faire le lien ici entre la dynamique de nage étudiée aux temps courts devant la durée d'un battement de flagelles et la dynamique de nage que nous venons de mesurer ici. Nous avons vu que le déplacement quadratique moyen dans la gamme de temps $\tau > 1/f_b$ suit un régime balistique de vitesse caractéristique v_a et que le MSD pour $\tau < t_a$ suit lui aussi un régime balistique de vitesse caractéristique v_a . Ces deux vitesses caractéristiques portent le même nom car elles mesurent la même quantité : la vitesse moyenne de déplacement en ligne droite des algues. On pourrait imaginer que ces deux vitesses soient différentes car entre les zigzags et les réorientations aléatoires, la cellule se déplace selon un mouvement hélicoïdal. Ce type de déplacement ralentissant la progression des algues par rapport au cas où elles iraient tout simplement en ligne droite, on aurait pu s'attendre à voir apparaître le temps caractéristique t_h dans l'évolution du MSD. Or lorsque l'on met sur la même figure les deux MSD obtenus dans chaque gamme de temps, on s'aperçoit que la liaison se fait bien même au niveau du temps de rotation hélicoïdal t_h . On peut le comprendre de la manière suivante. La rotation hélicoïdale est générée directement par chaque zigzag élémentaire au cours duquel il y a un léger angle entre la direction

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

de déplacement en marche avant lors de la poussée des flagelles dans le fluide et la direction de recul lors du retour des flagelles. Le MSD reflète donc déjà les rotations hélicoïdales même aux échelles de temps faiblement supérieures à la durée d'un battement. La vitesse de progression est donc déjà la vitesse moyenne de déplacement suivant l'hélice.

3 Modification de la dynamique de nage suivant la viscosité du fluide porteur

Le point clé dans la nage à bas nombre de Reynolds que pratiquent les *Chlamydomonas Reinhardtii* est que la propulsion n'est possible que grâce aux forces de traînées générées par la cellule. Le frottement visqueux est donc crucial à la dynamique des micro-nageurs. En faisant varier la viscosité du milieu, nous avons pu tirer des conclusions sur les effets des forces de frottement entre le fluide et le nageur sur la locomotion de micro-organismes tels que cette micro-algue [19]. De plus, La modification de la brique de base du mécanisme de déplacement des micro-algues risque de perturber toute la dynamique aux échelles de temps supérieures qui sont basées sur elle.

Pour cela, la viscosité du milieu a été augmentée par l'ajout de petites quantités de molécules de dextran (Sigma-Aldrich®). Ce polymère de glucose est connu pour sa neutralité vis à vis des organismes biologiques en général. La viscosité du milieu en fonction de la quantité de dextran ajoutée a été mesurée (figure 19). La masse molaire moléculaire des molécules de dextran ajoutées au milieu de culture est de 15,000 - 20,000. Les chaînes ne sont pas trop longues afin d'éviter les effets non-Newtonien, ni trop courtes pour éviter les effets de pression osmotique sur les algues.

3.1 Effet de la viscosité sur le mécanisme de locomotion des micro-algues

Dans un premier temps, nous étudions l'effet de l'augmentation de la viscosité du milieu sur le mécanisme de déplacement élémentaire des micro-algues : le zigzag.

3.1.1 Fréquence de battement des flagelles en fonction de la viscosité

Des trajectoires de cellules enregistrées à 400 Hz pour deux viscosités de milieu différentes ont été représentées (figure 20). Le mouvement de zigzag des nageurs dû à l'absence d'inertie ($Re \ll 1$) est bien visible. Dans ces exemples, les cellules nagent dans leur milieu de culture de viscosité $\eta = 1,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (à gauche) et dans un milieu enrichi en dextran de viscosité $3,7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (à droite). Leurs trajectoires sont représentées à la même échelle pour faciliter la comparaison. Pour une même durée, les cellules parcourent une distance plus faible dans le milieu le plus visqueux. La forme des trajectoires ne semble pas modifiée par l'augmentation de la viscosité. La

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

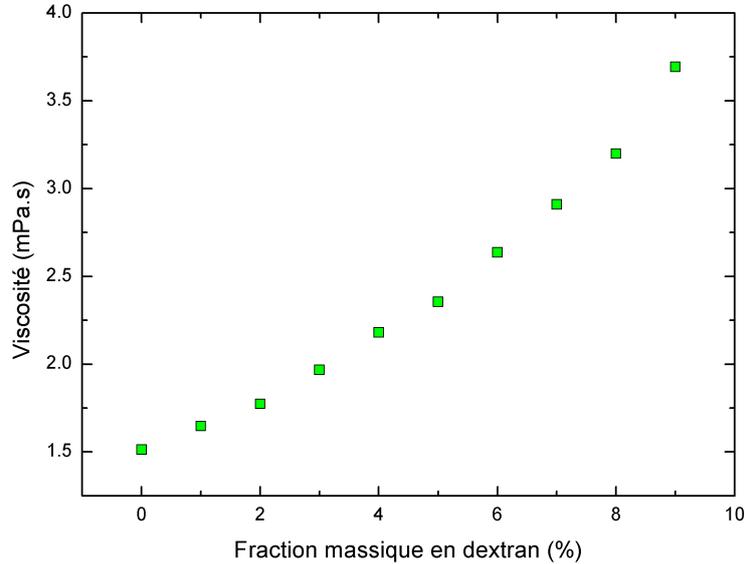


FIGURE 19. Viscosité de la solution en fonction de la fraction massique de dextran contenue. La masse molaire moléculaire des molécules de dextran utilisées est de 15,000 - 20,000 (Sigma-Aldrich®).

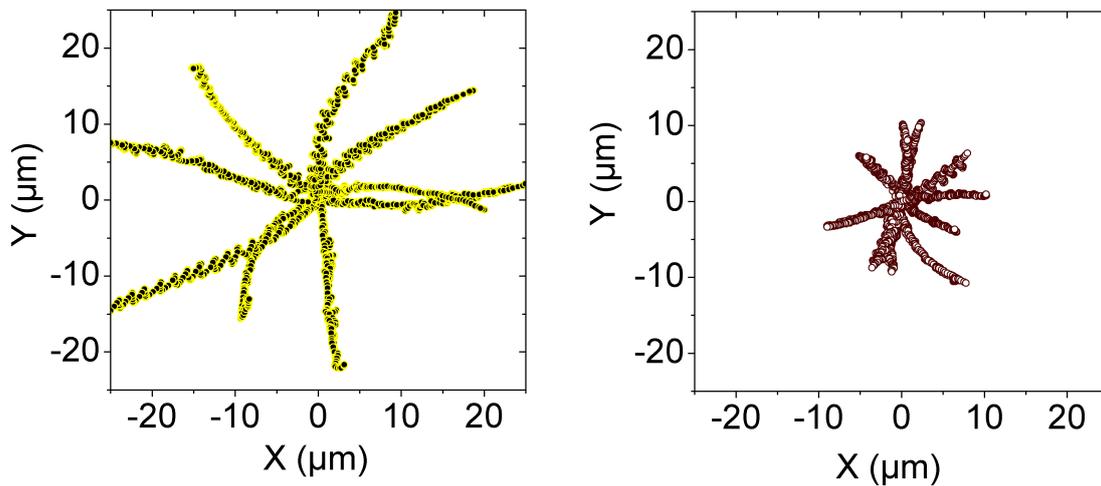


FIGURE 20. Trajectoires typiques bidimensionnelles (2D) de quelques cellules. À gauche : Les cellules baignent dans leur milieu de culture (viscosité $\eta = 1,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$). À droite : Le milieu est enrichi en dextran ($\eta = 3,7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$). Les trajectoires sont représentées à la même échelle pour une meilleure comparaison, leurs durées sont toutes exactement de 0,5 s. Les positions initiales ont toutes été ramenées à l'origine.

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

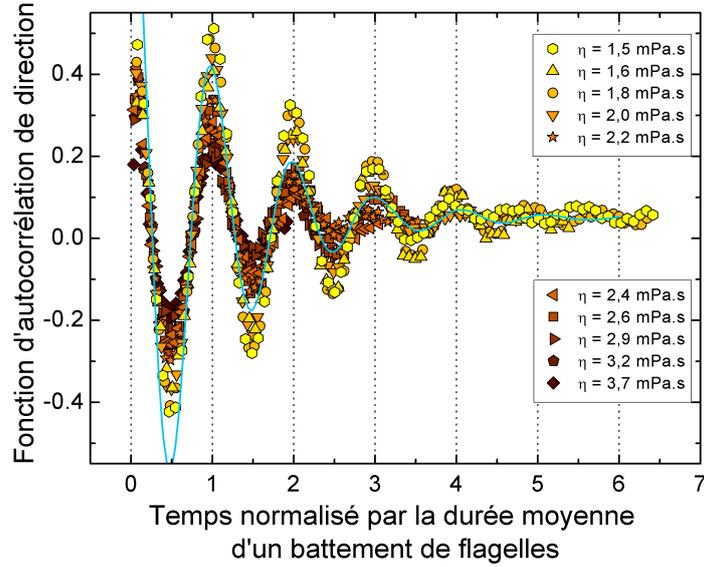


FIGURE 21. Les fonctions d'autocorrélation de direction en fonction de la viscosité du milieu. Le temps τ est normalisé par la période $1/f_b$ des oscillations du signal, qui correspond à la fréquence de battement de flagelles. Les symboles correspondent aux différentes viscosités des milieux utilisés. La ligne continue représente la fonction $\cos(2\pi\tau f_b) \exp(-\tau/t_e)$. La fréquence de battement des flagelles la plus élevée est obtenue dans le milieu le moins visqueux (31,3 Hz) et la fréquence la plus faible dans le milieu le plus visqueux (13,0 Hz).

fréquence moyenne de battement mesurée vaut 31,3 Hz pour le milieu de culture et 13,0 Hz pour le milieu le plus visqueux.

Nous avons mesuré la dépendance de la fréquence moyenne de battement à la viscosité du milieu (figure 22) par ajustement des fonctions d'autocorrélation en fonction de la viscosité du milieu par la méthode décrite au paragraphe III.1. (figure 21).

Nous voyons que la fréquence moyenne de battement des algues est proportionnelle à l'inverse de la viscosité du milieu. Comme la viscosité augmente, la fréquence de battement diminue, variant de 31 à 13 Hz pour une variation de la viscosité de 1,5 à 3,7 mPa·s, donnant une pente $\alpha = 0,045 \pm 0,01$ Pa.

La durée moyenne d'un battement augmente linéairement avec la viscosité, ainsi augmenter la viscosité d'un facteur donné a pour effet de ralentir la dynamique de battement du même facteur.

3.1.2 Diminution de la vitesse moyenne sur un zigzag avec la viscosité du milieu

Les valeurs de la vitesse balistique v_b ont été obtenues par ajustement de la première partie balistique des déplacements quadratiques moyens par la fonction $\langle r^2(\tau) \rangle = v_b^2 \tau^2$ (figure 23). La deuxième partie balistique du MSD est étudiée au paragraphe III.2, lors de l'étude de la marche aléatoire des algues. Cette vitesse balistique v_b est inversement proportionnelle à la viscosité du bain (figure 24). La vitesse

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

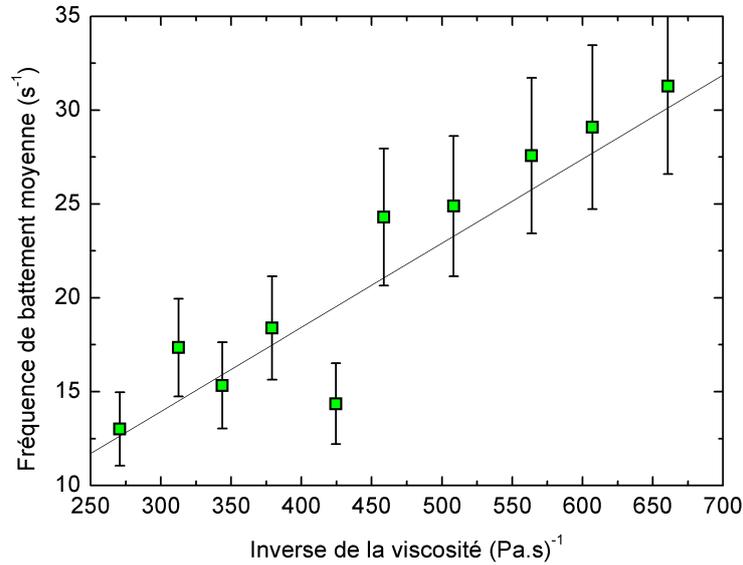


FIGURE 22. Fréquence de battement moyenne obtenue à partir de la période des oscillations des fonctions d'autocorrélation de direction, en fonction de l'inverse de la viscosité du milieu. La droite est le résultat d'une régression linéaire de pente $a_{f_b} = 0,045 \pm 0,01$ Pa.

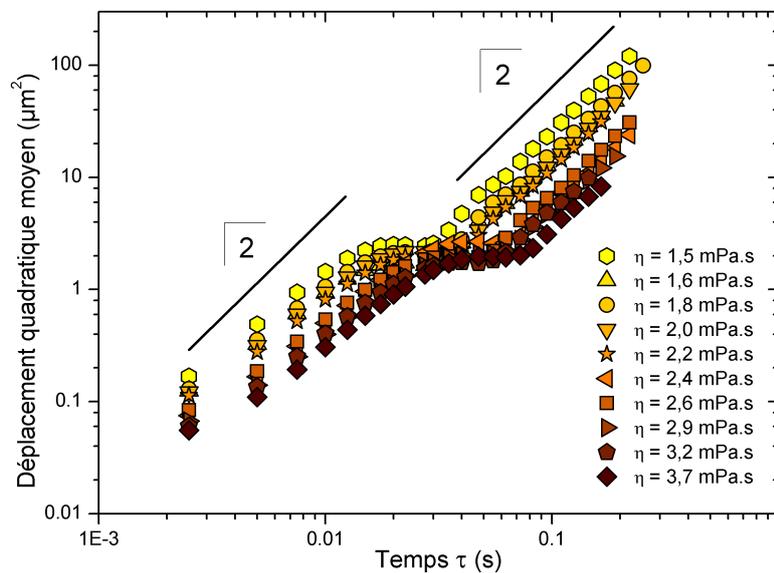


FIGURE 23. Déplacement quadratique moyen $\langle r^2(\tau) \rangle$ de micro-nageurs en fonction du temps pour des milieux de différentes viscosités. Les différents symboles représentent différentes viscosités. Les lignes pleines représentent une pente de 2 en échelle log-log. La pente aux temps courts correspond aux régimes des zigzags avec une vitesse balistique v_b et la pente aux temps plus longs correspond à la vitesse balistique moyenne v_a .

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

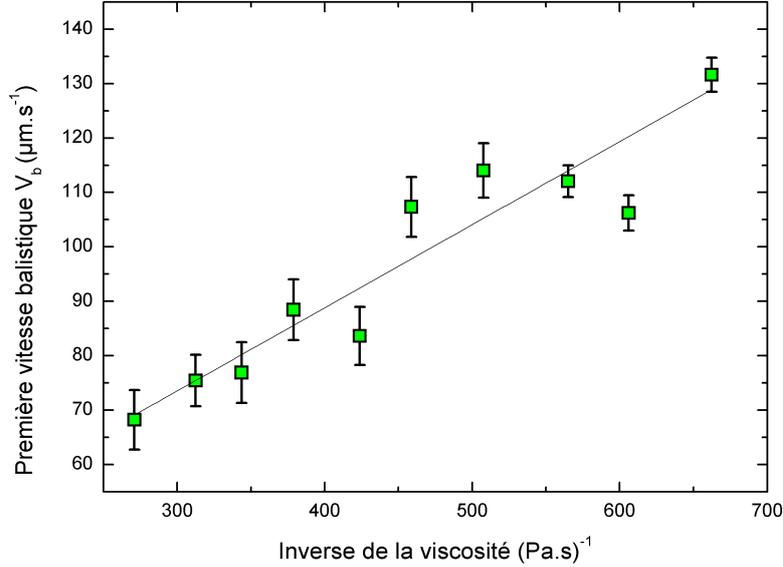


FIGURE 24. Vitesse du premier régime balistique v_b en fonction de l'inverse de la viscosité du milieu. La droite représente une régression linéaire de pente $153 \pm 21 \text{ mPa} \cdot \mu\text{m}$.

décroit de 135 à $75 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une variation de la viscosité de $1,5$ à $3,7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, avec une pente $\alpha = 153 \pm 21 \text{ mPa} \cdot \mu\text{m}$. La force de propulsion correspondant à la force de friction exercée par le fluide sur la cellule, laquelle est proportionnelle au produit ηv , est alors constante. Ce résultat supporte donc l'idée que le mécanisme de propulsion se fait à force imposée [54].

3.1.3 Estimation de la friction effective des flagelles

Nous avons obtenu de premiers résultats en analysant indépendamment le comportement de la fréquence moyenne de battement des cellules et celui de la vitesse moyenne pendant un mouvement de nage en fonction de la force de friction appliquée aux flagelles. En combinant les résultats obtenus, nous pouvons estimer l'efficacité de la stratégie de nage utilisée par ce type de micro-nageur. Pour cela, nous pouvons estimer une longueur efficace de friction des flagelles. Imaginons que la cellule se déplace en utilisant ses flagelles le plus efficacement possible. Pendant la phase de poussée, les flagelles sont complètement étendues et se déplacent perpendiculairement à leur grand axe (ainsi la friction est maximale), sur une distance de l'ordre du diamètre de la cellule (figure 25). Pendant la phase de retour, les flagelles sont repliées le long du corps et se déplacent parallèlement à leur grand axe (la friction est minimale), sur une distance de l'ordre du diamètre de la cellule.

En se plaçant dans le cadre de la théorie des forces résistives [44], le déplacement de ces flagelles à une vitesse v_{\perp} et v_{\parallel} crée une friction visqueuse dans le fluide égale à :

$$\mathbf{F}_{\perp} = -\zeta_{\perp} \eta \mathbf{v}_{\perp} \quad (\text{III.18})$$

$$\mathbf{F}_{\parallel} = -\zeta_{\parallel} \eta \mathbf{v}_{\parallel} \quad (\text{III.19})$$

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

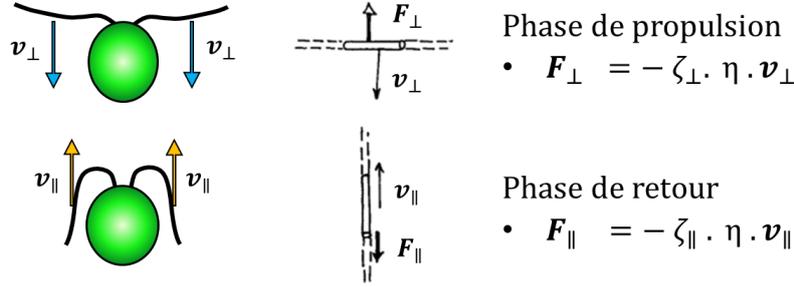


FIGURE 25. Modèle équivalent de la friction exercée par les flagelles d'un micro-nageur au cours d'un mouvement de nage.

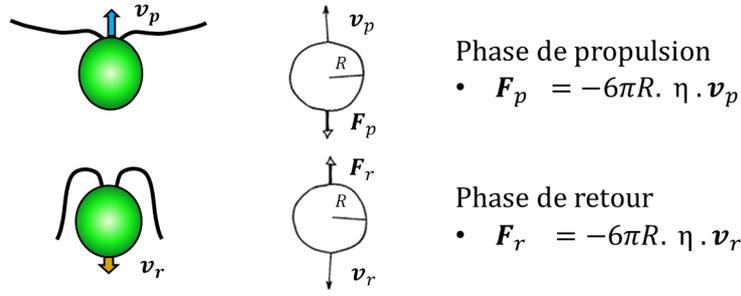


FIGURE 26. Modèle équivalent de la friction exercée par le corps d'un micro-nageur au cours d'un mouvement de nage.

avec ζ_{\perp} et ζ_{\parallel} les coefficients de friction visqueuse du flagelle dans sa direction normale et tangentielle. Le corps des *Chlamydomonas Reinhardtii* est quasi-sphérique (figure 26). Ainsi la vitesse moyenne du corps pendant la phase de propulsion et la phase de retour \mathbf{v}_p et \mathbf{v}_r peuvent être reliées à la force de friction moyenne exercée par le fluide sur le corps de la cellule \mathbf{F}_p et \mathbf{F}_r par la loi de Stokes pour une sphère :

$$\mathbf{F} = -6\pi R\eta\mathbf{v} \tag{III.20}$$

En faisant le bilan de ces forces pendant chacune des phases, on arrive aux équations suivantes :

$$2\zeta_{\perp}\eta v_{\perp} = 6\pi R\eta v_p \tag{III.21}$$

$$2\zeta_{\parallel}\eta v_{\parallel} = 6\pi R\eta v_r \tag{III.22}$$

Nous avons observé expérimentalement que les durées des phases de propulsion et de retour étaient similaires.

Comme les flagelles parcourent dans chaque phase une distance égale au diamètre d'une cellule, on peut établir que la vitesse moyenne des flagelles est égale au diamètre de la cellule divisé par la moitié de la période de battement $1/f_b$:

$$v_{\perp} = v_{\parallel} = \frac{2R}{1/(2f_b)} = 4Rf_b \tag{III.23}$$

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

De plus, comme les durées des deux phases du mouvement sont égales, la moyenne sur un cycle du module de la vitesse instantanée (soit la vitesse balistique v_b mesurée dans le premier régime balistique) est égale à la demi somme de la moyenne du module de vitesse instantanée pendant la phase de propulsion $\overline{v_p}$ et de la moyenne du module de vitesse instantanée pendant la phase de retour $\overline{v_r}$:

$$v_b = \frac{\overline{v_p} + \overline{v_r}}{2} \quad (\text{III.24})$$

Nous obtenons alors en sommant les équations III.21 et III.22 et en simplifiant :

$$(\zeta_{\perp} + \zeta_{\parallel})(\eta f_b) = (3\pi/2)(\eta v_b) \quad (\text{III.25})$$

On retrouve dans cette équation les deux grandeurs que l'on a mesurées : les produits ηf_b et ηv_b . En remplaçant par les valeurs trouvées expérimentalement, on obtient la relation suivante :

$$\zeta_{\perp} + \zeta_{\parallel} = (3\pi/2)a_v/a_{f_b} \simeq 16 \mu\text{m} \quad (\text{III.26})$$

Considérons qu'un flagelle est un cylindre de longueur L et de diamètre d . On peut définir son rapport d'aspect comme $p = L/d$. Pour le flagelle d'une *Chlamydomonas Reinhardtii*, $L \simeq 10 \mu\text{m}$ et $d \simeq 0,2 \mu\text{m}$ soit $p \simeq 50$. Soient D_{\perp} et D_{\parallel} les coefficients de diffusion translationnelle d'un cylindre dans les directions normales et tangentielles à son axe et ζ_{\perp} et ζ_{\parallel} ses coefficients de friction dans les directions normales et tangentielles à son axe. En utilisant la relation d'Einstein généralisée $D = (k_b T)/(\zeta \cdot \eta)$, on peut écrire :

$$\zeta_{\perp} = k_b T / (D_{\perp} \eta) \quad (\text{III.27})$$

$$\zeta_{\parallel} = k_b T / (D_{\parallel} \eta) \quad (\text{III.28})$$

avec $k_b T$ le facteur de Boltzmann et η la viscosité du milieu.

Pour exprimer le lien entre les coefficients de diffusion translationnelle D_{\perp} et D_{\parallel} , et les dimensions du flagelle effectif, nous avons utilisé le modèle de Tirado et Garcia de la Torre [75]. Ce modèle est valide pour des cylindres de rapport d'aspect p compris entre 0,4 et 125. Il s'applique donc à un flagelle de rapport d'aspect de 50. Le modèle donne les expressions suivantes :

$$4\pi \cdot L \cdot \eta \cdot D_{\perp} / (k_b T) = \ln p + \nu_{\perp} \quad (\text{III.29})$$

$$2\pi \cdot L \cdot \eta \cdot D_{\parallel} / (k_b T) = \ln p + \nu_{\parallel} \quad (\text{III.30})$$

avec les coefficients géométriques ν_{\perp} et ν_{\parallel} valant :

$$\nu_{\perp} = 0,839 + 0,185/p + 0,233/p^2 \quad (\text{III.31})$$

$$\nu_{\parallel} = -0,207 + 0,980/p - 0,133/p^2 \quad (\text{III.32})$$

On obtient ainsi pour ζ_{\perp} et ζ_{\parallel} :

$$\zeta_{\perp} = 4\pi L / (\ln p + 0,839 + 0,185/p + 0,233/p^2) \quad (\text{III.33})$$

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

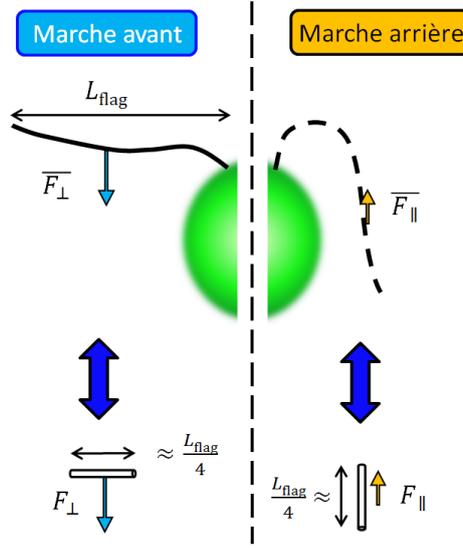


FIGURE 27. Modèle équivalent de la friction générée par un flagelle pendant un cycle de battement.

La friction générée est équivalente à celle générée par un cylindre de même diamètre que le flagelle d'une *Chlamydomonas Reinhardtii* et d'un quart de sa longueur qui se déplacerait avec son grand axe perpendiculaire à la direction du mouvement pendant la phase de poussée, depuis le haut du corps de la cellule jusqu'en bas puis qui parcourrait la même distance, cette fois ci avec son axe parallèle à la direction du mouvement de la cellule de bas en haut.

$$\zeta_{\parallel} = 2\pi L / (\ln p - 0,207 + 0,980/p - 0,133/p^2) \quad (\text{III.34})$$

soit :

$$\zeta_{\perp} + \zeta_{\parallel} = 2\pi \cdot L (2 / (\ln p + 0,839 + 0,185/p + 0,233/p^2) + 1 / (\ln p - 0,207 + 0,980/p - 0,133/p^2)) \quad (\text{III.35})$$

Pour la somme $\zeta_{\perp} + \zeta_{\parallel}$ que nous avons mesurée, le rapport d'aspect p obtenu avec ce modèle vaut $13 \pm 0,5$. Cela donne pour un flagelle de diamètre $0,2 \mu\text{m}$, une longueur de flagelle de l'ordre du quart de la longueur réelle du flagelle (figure 27). Cette estimation semble raisonnable, étant donné que les flagelles ne sont pas parfaitement perpendiculaires (parallèles) à la direction moyenne de déplacement pendant la phase de propulsion (retour), et que la distance parcourue par un morceau du flagelle situé proche de la base est plus courte que celle parcourue pour un morceau situé près de l'extrémité. Ce résultat pourrait être utilisé pour définir un modèle numérique de flagelle battant simple. Jusqu'à maintenant les modèles donnant des résultats réalistes pour le champ de vitesse autour d'une *Chlamydomonas Reinhardtii* sont des modèles de champ de vitesse moyen. En comparant les résultats de ce type de modèle avec l'allure du champ de vitesse instantané obtenu expérimentalement par Guasto et al. [22], il serait possible d'avancer dans la compréhension du mécanisme de mouvement de déplacement instantané des algues et des conséquences du mouvement en zigzags lorsque plusieurs algues se trouvent à proximité.

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

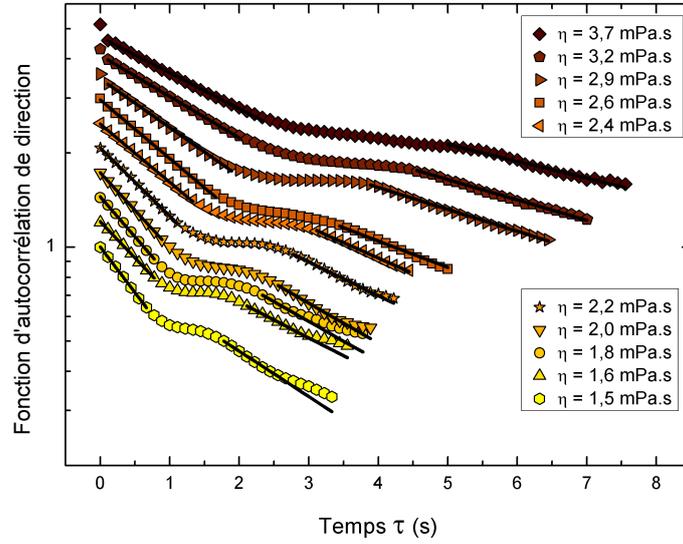


FIGURE 28. Fonction d'autocorrélation de direction $C(\tau)$ en fonction de la viscosité du milieu. Le pas de temps utilisé pour la mesure de la direction de déplacement est $2\Delta t = 0,2$ s. Pour une meilleure visibilité, toutes les courbes ont été décalées logarithmiquement par un facteur 1,2 en hauteur. Les valeurs des pentes en log-lin sont donc conservées. La véritable valeur de $C(0)$ quelque soit la viscosité est de 1. On observe les premières pentes de décroissance exponentielle correspondant aux régimes des rotations hélicoïdales, suivies d'un plateau puis du deuxième régime de décroissance exponentielle correspondant aux réorientations aléatoires. Les fonctions exponentielles décroissantes obtenues par ajustement des premières et deuxièmes parties décroissantes de $C(\tau)$ sont superposées aux données (lignes pleines).

3.2 Effet de la viscosité sur la marche aléatoire

3.2.1 Dépendance du temps balistique et du temps de rotation hélicoïdale à la viscosité

Nous avons mesuré la fonction d'autocorrélation de direction pour mesurer le temps de rotation hélicoïdale t_h et le temps de réorientation aléatoire t_a (figure 28). Lorsque la viscosité augmente, on observe que la première pente décroissante de $C(\tau)$ se décale vers le bas par rapport au point $(\tau = 0, C(\tau) = 1)$. Cela s'explique par le fait que la fréquence de battement des flagelles diminue également lorsque la viscosité augmente, jusqu'à devenir de l'ordre de la fréquence d'acquisition des images. Ainsi le mécanisme de nage en zigzags devient visible sur les trajectoires et « bruite » la fonction d'autocorrélation de direction. Nous avons évoqué cette possibilité à la fin du paragraphe III.2.2.3. Nous avons fait l'analogie entre la mesure du temps de réorientation aléatoire t_a qui était perturbée par le « bruit des rotations hélicoïdales », et la mesure de la durée d'un pas de l'hélice qui pourrait être perturbée si les déplacements en zigzags devenaient visibles sur les trajectoires utilisées pour le calcul de la fonction d'autocorrélation de direction. Le temps t_h est donc extrait de la même manière que t_a . On ajuste sur la première pente décroissante de $C(\tau)$, une

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

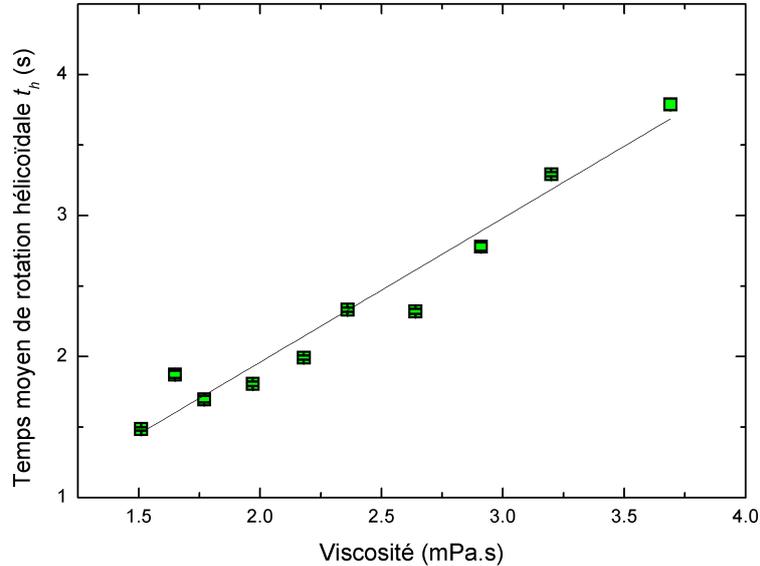


FIGURE 29. Temps moyen de rotation t_h autour de la direction de déplacement moyenne en fonction de la viscosité du milieu. Le temps t_h a été obtenu par ajustement d'une fonction exponentielle décroissante sur la première partie décroissante de la fonction d'autocorrélation de direction. Les barres d'erreur sur la mesure de t_h ont été calculées en prenant l'écart type entre plusieurs résultats d'ajustement, en variant les points utilisés pour l'ajustement. La ligne noire est le résultat d'un ajustement des points expérimentaux par une fonction affine de pente $1,02 \pm 0,07 \text{ mPa}^{-1}$.

fonction exponentielle décroissante multipliée par une constante inférieure à l'unité prenant en compte la présence des zigzags dans les trajectoires.

Nous mesurons donc t_a avec le même principe, en ajustant sur la deuxième partie décroissante de la courbe une fonction exponentielle décroissante avec un coefficient multiplicatif inférieur à 1. Les valeurs obtenues pour le temps de rotation hélicoïdale t_h et le temps de réorientation aléatoire t_a en fonction de la viscosité du milieu sont représentées sur les figures 29 et 30.

Le temps de rotation hélicoïdale t_h augmente linéairement avec la viscosité. Ce temps peut être exprimé comme un certain nombre de battements de flagelles multiplié par la durée d'un battement. La durée d'un battement de flagelles est elle aussi proportionnelle à la viscosité. Cela signifie que le nombre de battements nécessaires à la réalisation d'une rotation hélicoïdale est constant en fonction de la viscosité. On en déduit que l'asymétrie de battement des flagelles n'est pas modifiée par la viscosité du milieu.

Pour le temps de réorientation aléatoire t_a , le même raisonnement peut être fait. Ainsi, le nombre de battements entre deux réorientations aléatoires est constant par rapport à viscosité. Le mécanisme responsable de la désynchronisation des flagelles et donc de la génération des réorientations aléatoires n'est pas déterminé à ce jour. Une hypothèse serait que ce mécanisme proviendrait de bruit de nature biochimique dans la « chaîne de production » du mouvement du flagelle [21, 52]. Notre résultat

3. MODIFICATION DE LA DYNAMIQUE DE NAGE SUIVANT LA VISCOSITÉ DU FLUIDE PORTEUR

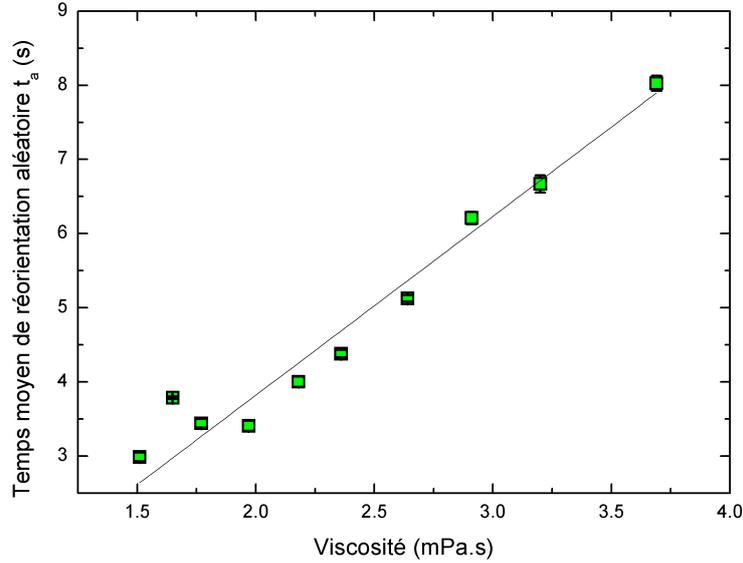


FIGURE 30. Temps de réorientation aléatoire t_a en fonction de la viscosité du milieu. t_a a été obtenu par ajustement de la deuxième partie décroissante de la fonction d'autocorrélation de direction par une fonction exponentielle décroissante. Les barres d'erreur sur la mesure de t_a sont celle des ajustements. La ligne noire est le résultat d'un ajustement des points expérimentaux par une fonction affine de pente $2,4 \pm 0,1 \text{ mPa}^{-1}$.

pourra participer à tester cette prédiction.

3.2.2 Modification de la vitesse balistique

Nous avons étudié les effets des forces visqueuses sur les déplacements quadratiques moyens pour une échelle de temps supérieure à la durée moyenne d'un battement de flagelles. Les MSD obtenus dans chaque gamme temporelle étudiée ont été reportés sur une même figure pour mettre en évidence l'ensemble des régimes de la dynamique (figure 31). Nous avons reporté d'une part les MSD acquis lors de l'étude du mécanisme de base de la nage dans une gamme temporelle d'environ 10^{-3} à 3 s et d'autre part les MSD mesurés pour l'analyse de la dynamique hélicoïdale et des réorientations aléatoires dans un gamme temporelle de 10^{-1} à 20 s. On observe que les deux familles de courbes se superposent bien dans leur gamme temporelle commune.

Les valeurs obtenues pour la vitesse balistique du deuxième régime balistique v_a en fonction de la viscosité du milieu ont été représentées également (figure 32). La vitesse v_a est inversement proportionnelle à la viscosité du bain η . En utilisant le même raisonnement qu'au paragraphe III.3.1.3, si $v_a \propto 1/\eta$, alors la force de friction exercée par le fluide sur l'objet est indépendante de la viscosité du milieu. Cela suggère ici que la force moyennée sur plusieurs périodes de battements des flagelles est indépendante de la viscosité du fluide porteur. Cette force moyenne résulte de la force instantanée appliquée par les flagelles sur le fluide au cours d'un battement et

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

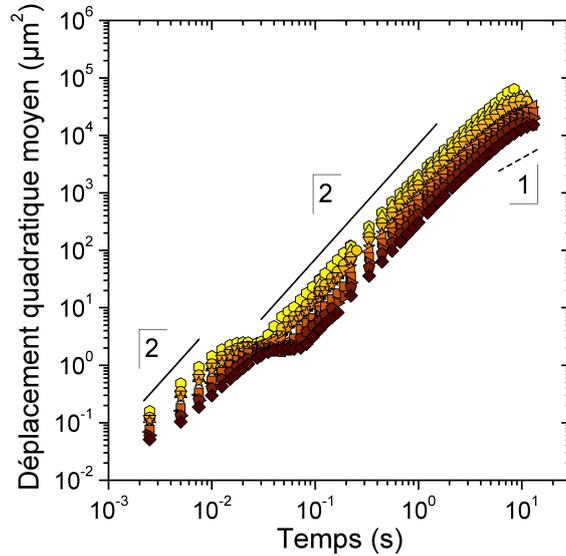


FIGURE 31. Déplacement quadratique moyen $\langle r^2(\tau) \rangle$ de micro-nageurs en fonction du temps pour des milieux de différentes viscosités. Les différents symboles représentent différentes viscosités. La légende est la même que celle de la figure 21. Les lignes pleines représentent une pente de 2 en échelle log-log et la ligne pointillée une pente de 1.

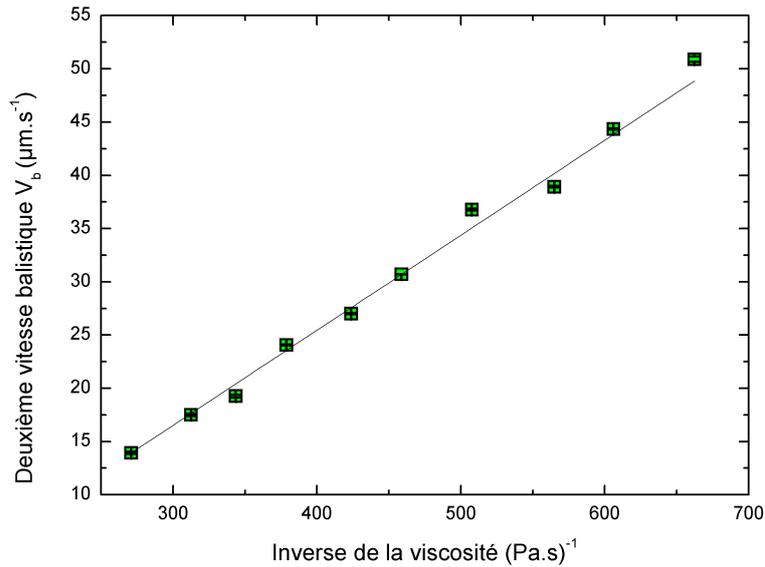


FIGURE 32. Vitesse v_a du deuxième régime balistique de la dynamique en fonction de la viscosité. Cette vitesse caractéristique est la vitesse moyenne des algues entre deux réorientations aléatoires. La ligne noire est le résultat d'un ajustement des points expérimentaux par une fonction affine de pente $89 \pm 3 \mu\text{m} \cdot \text{mPa}^{-1}$.

4. EN RÉSUMÉ

de l'efficacité d'un battement.

Nous avons vu au paragraphe III.3.1.3 que les forces appliquées sur le fluide par la cellule pour se mouvoir ne changeaient pas dans cette gamme de viscosité. On peut en déduire que l'efficacité avec laquelle les flagelles propulsent la cellule ne change pas lorsque l'on modifie la viscosité. Cela suggère que le cycle de déformation utilisé par les flagelles n'est pas modifié par l'augmentation de la charge.

4 En résumé

Dans ce chapitre, nous avons quantifié la dynamique complexe de nage sur toute sa gamme temporelle en utilisant la microscopie en champ clair couplée à un dispositif d'imagerie à basse et haute fréquence ainsi qu'une technique de suivi de particules. Les outils statistiques pour une description quantitative du mécanisme de locomotion employé ainsi que de la marche aléatoire qui en résulte ont été présentés.

Cette étude a permis d'analyser le mécanisme de nage de type « mouvement de brasse » des cellules *Chlamydomonas Reinhardtii* dans un fluide à faible nombre de Reynolds. Ces micro-nageurs se déplacent grâce à un mouvement de brasse en déformant leurs flagelles de manière non-réciproque à une fréquence moyenne f_b de l'ordre de la trentaine de Hz, déplaçant leur corps à une vitesse moyenne pendant un battement v_b de l'ordre de $100 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une viscosité du milieu proche de celle de l'eau. Sur des échelles de temps de l'ordre de la seconde, ces micro-algues se déplacent selon une direction moyenne avec un mouvement hélicoïdal, en effectuant un tour autour de leur axe de déplacement moyen en un temps t_h . Au bout de quelques rotations autour d'un axe de déplacement moyen à une vitesse de translation v_a de l'ordre de $30 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, ces cellules se réorientent aléatoirement au bout d'un temps moyen t_a et reprennent leur dynamique de nage hélicoïdale dans une autre direction.

En variant la viscosité du fluide porteur, nous avons étudié comment cette dynamique de nage complexe était modifiée et quelles informations nous pouvions obtenir sur ces micro-nageurs.

La force déployée par ce type de cellules pour se mouvoir reste la même dans un milieu plus de deux fois plus visqueux que son milieu de culture. Ainsi la cellule ne semble pas essayer de s'adapter à son nouvel environnement en tâchant de garder la même vitesse de déplacement, elle continue simplement de nager avec la même force. L'efficacité du mécanisme de nage mesurée comme le rapport de la vitesse balistique à la vitesse moyenne sur un zigzag ne varie pas avec la viscosité. Cela suggère que la forme des flagelles au cours du mouvement de brasse n'est pas modifiée par la viscosité du milieu.

La friction exercée sur une micro-algue a été qualitativement extraite du mouvement de va-et-vient d'une paire de flagelles plus courts. Le résultat que nous avons obtenu fournit une indication sur les dimensions à choisir pour le design d'un modèle numérique simple de flagelle battant qui permettrait d'étudier le champ de vitesse instantané produit par une micro-algue.

Nous avons vu que le temps moyen de battement des flagelles $1/f_b$, le temps

CHAPITRE III. DYNAMIQUE DE NAGE INDIVIDUELLE EN SUSPENSION DILUÉE

moyen de rotation hélicoïdale t_h et le temps moyen de réorientation aléatoire t_a étaient tous proportionnels à la viscosité du milieu dans lequel évoluent les algues. Ces observations peuvent être utilisées expérimentalement pour ralentir artificiellement le mouvement dans le but de l'étudier plus en détail par exemple (notamment le mécanisme de battement des flagelles qui n'est pas encore totalement résolu, contrairement au mécanisme utilisé par les cellules procaryotes (E.coli en particulier)). Nous avons déduit du fait que le nombre de battements moyen pendant une rotation hélicoïdale était constant que l'asymétrie entre les deux flagelles lors du battement n'était pas modifiée par la viscosité. Le fait que le temps moyen de réorientation aléatoire t_a varie avec la viscosité semble indiquer que le mécanisme de réorientation aléatoire des algues ne semble pas basé sur une horloge de temps absolue mais plutôt sur un nombre de battements avant le déclenchement d'un changement d'orientation. Cette observation est en contradiction avec l'idée que le mécanisme de réorientation soit principalement basé sur du bruit moléculaire dans la chaîne de production du mouvement des flagelles [52].

Chapitre IV

Effets collectifs en suspension semi-diluée

Sommaire

1	Motivation	84
2	Dispositif expérimental	84
2.1	Préparation des échantillons	84
2.2	Microscopie en champ clair d'une suspension dense de micro-nageurs	85
2.3	Microscopie en épifluorescence	86
2.4	Choix du grossissement de l'objectif pour maximiser la précision de la statistique	92
2.5	Reconstruction de trajectoires	93
2.6	Gamme d'étude de la fraction volumique	95
3	Dynamique de nage des <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> en suspension semi-diluée	98
3.1	Dynamique d'orientation des micro-algues <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	98
3.2	Mesure des vitesses	101
3.3	Longueurs de persistance et distance moyenne inter-nageurs	105
4	Discussion	107
4.1	Distance moyenne inter-nageurs à la transition entre les deux régimes de comportement des temps de corrélation de direction	107
4.2	Identification des temps de corrélation obtenus en fonction de la fraction volumique dans le régime dilué	107
4.3	Comparaison des temps de corrélation en régime dilué avec ceux mesurés au chapitre précédent	108
4.4	Identification des temps de corrélation en régime semi-dilué	109
4.5	Évolution des temps et longueurs de corrélation avec la distance moyenne inter-nageurs	109

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

4.6	Étude de la vitesse en régime semi-dilué	114
5	Résumé et perspectives	115
	Annexes	117

1 Motivation

Au chapitre I, nous avons mentionné que l'on pouvait observer dans les suspensions de micro-nageurs des phénomènes à des échelles grandes en comparaison de la taille du système. Par exemple, nous avons évoqué qu'il se formait des motifs complexes dans les suspensions de micro-nageurs de type « pusher » dans une certaine gamme de fraction volumique. Nous avons rappelé également que la viscosité d'une suspension de micro-nageurs pouvait différer de celle d'une suspension d'objets inertes de même forme. Nous avons vu que cette variation de viscosité dépendait de la concentration en micro-nageurs et de leur type.

La détermination des caractéristiques microscopiques qui permettent d'obtenir ces phénomènes macroscopiques et la compréhension du lien qui les unit est un challenge. Pour progresser dans ce sens, nous avons caractérisé quantitativement au chapitre III la dynamique individuelle des micro-nageurs *Chlamydomonas Reinhardtii* dans le cas d'une suspension diluée. Pour tenter de lier les effets complexes observés à la dynamique des nageurs, nous allons maintenant nous intéresser aux effets de la concentration en nageurs sur la dynamique de nage. Nous allons tout d'abord étudier la dynamique individuelle des nageurs. Nous montrons dans ce chapitre comment les quantités statistiques individuelles que nous avons étudiées au chapitre III sont modifiées lorsque la fraction volumique de nageurs augmente.

2 Dispositif expérimental

Nous souhaitons ici observer la dynamique **collective** des micro-nageurs. Nous avons mis en place au chapitre II un dispositif et un protocole permettant de quantifier la dynamique **individuelle** des micro-nageurs. Nous les réutilisons pour quantifier la dynamique collective en les adaptant aux spécificités des suspensions concentrées.

2.1 Préparation des échantillons

L'étape de préparation des échantillons est légèrement modifiée par rapport au cas de l'étude en suspensions diluées (cf. paragraphe II.2). La culture d'algues est réalisée selon le protocole développé au paragraphe II.1. Lorsque la culture est prête, on remplace le milieu de culture par du milieu frais puis on laisse la culture reposer une heure dans l'incubateur. On la centrifuge ensuite à une accélération de 120 g pendant dix minutes, puis le liquide surnageant est éliminé par aspiration pour ne garder qu'un culot concentré d'algues. Le concentré est ensuite mis dans un tube de contenance 0,5 mL auquel est ajoutée une petite quantité de milieu TAP

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

pour obtenir une première suspension concentrée de *Chlamydomonas Reinhardtii*. Cette opération nous permet d'obtenir une suspension dont la fraction volumique est proche de 25 %. On reprend ensuite une partie de cette suspension pour réaliser dans un nouveau tube une suspension diluée avec du TAP d'un certain facteur par rapport à la première. On répète l'opération jusqu'à avoir une dizaine de dilutions différentes. Nous avons étudié des suspensions de fraction volumique allant de 0,04 % à 5 %. Les valeurs précises des fractions volumiques utilisées sont données plus loin au paragraphe IV.2.6.

Nous avons préalablement préparé des capillaires d'épaisseur 200 μm et de largeur 2 mm en suivant le protocole du paragraphe II.2. Les différentes configurations sont analysées dans un ordre aléatoire pour éviter de biaiser les résultats avec une éventuelle variation du comportement des nageurs en fonction du temps. On remplit un capillaire avec des suspensions préparées en veillant à laisser de l'air de chaque côté du capillaire. Cela évite de créer des gradients d'oxygène d'un côté vers l'autre du tube. On scelle ensuite chaque embout du capillaire avec de la pâte de scellement pour hématocrite.

Le capillaire est ensuite positionné sur une fine lamelle de microscope et placé sur la platine du microscope dans l'obscurité. Nous éclairons l'échantillon en lumière rouge quelques secondes, le temps de positionner le plan d'observation au centre du capillaire sans perturber les algues. Nous laissons ensuite l'échantillon reposer cinq minutes. Ce temps d'attente est suffisant pour que la suspension s'homogénéise et pour que la vitesse de nage moyenne des algues redevienne stable après la mise en capillaire.

2.2 Microscopie en champ clair d'une suspension dense de micro-nageurs

L'augmentation de la concentration en micro-nageurs dans le milieu amène à repenser le dispositif de mesure utilisé au chapitre III. Pour obtenir une image précise d'un plan, il faut que la lumière parvenant à celui-ci n'ait pas rencontré trop d'obstacles sur son passage, ni qu'elle en rencontre trop avant de parvenir ensuite au détecteur. Pour visualiser la quantité de nageurs rencontrés par la lumière lors de la traversée de l'échantillon dans le cas d'une suspension semi-diluée, on peut considérer un volume d'échantillon V de dimensions $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$. Lorsque $\phi \simeq 0,07 \%$ (suspension diluée), ce volume contient un nageur en moyenne. (figure 1). Dans ces conditions et en supposant que la lumière ne soit pas déviée, elle va rencontrer en passant à travers ce volume en moyenne un seul nageur. L'image de ce nageur sera donc bien reconstruite.

Dans le cas des suspensions diluées étudiées au chapitre III, la fraction volumique était de l'ordre de 0,05 %. Cela représente un nombre de *Chlamydomonas Reinhardtii* dans le volume V inférieur à un. Les images des nageurs obtenues pouvaient être de bonne qualité puisque le trajet lumineux était très peu perturbé.

Dans le cas d'une suspension semi-diluée de fraction volumique de l'ordre de 2 %, la lumière passant dans ce volume devrait rencontrer sur son trajet 28 nageurs

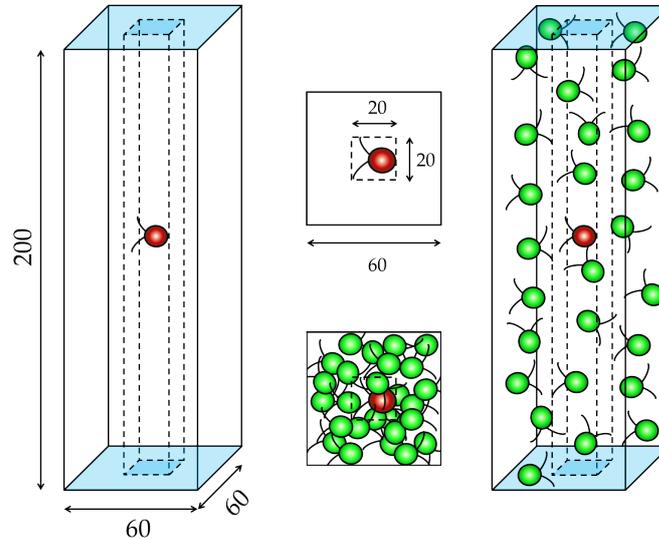


FIGURE 1. Schéma d'une coupe d'échantillon centrée sur un nageur et observation en vue de dessus pour une suspension diluée et une suspension semi-diluée. À gauche : Suspension diluée ($\phi \simeq 0,07\%$). Au centre : Vues de dessus. À droite : Suspension semi-diluée ($\phi \simeq 2\%$). La hauteur de la coupe est la même que celle de l'échantillon et la fenêtre carrée d'observation est longue de trois fois l'extension spatiale d'une *Chlamydomonas Reinhardtii*. L'unité de longueur est le micromètre.

en moyenne si elle n'était pas déviée. Cela perturberait notablement le chemin des rayons lumineux et ne permettrait pas l'obtention d'une image nette d'un nageur (voir la vue de dessus du volume V en suspension semi-diluée sur la figure 1).

On peut remédier à cela de plusieurs manières. Réduire l'épaisseur de l'échantillon est une solution. Ainsi la lumière transmise rencontre moins de diffuseurs et l'image est mieux reconstruite. Comme nous souhaitons avoir la même épaisseur d'échantillon pour toutes les concentrations testées et que nous voulons éviter les effets de bord (la dynamique en milieu confiné par des parois n'est pas l'objet de notre étude), nous pouvons diminuer la profondeur de l'échantillon à traverser en utilisant un système d'illumination en réflexion et en modifiant la hauteur du plan d'observation.

2.3 Microscopie en épifluorescence

Pour cela, nous avons observé nos échantillons en microscopie de fluorescence. La microscopie par épifluorescence fonctionne de la manière suivante [82]. On illumine un milieu contenant des objets fluorescents. Ces objets absorbent la lumière dont la longueur d'onde est dans leur gamme de longueur d'onde d'excitation et la réémettent dans leur gamme de longueur d'onde d'émission. Cette lumière réémise est récupérée pour former une image des objets fluorescents. Pour éviter de récupérer la lumière d'excitation avec la lumière d'émission, on utilise en épifluorescence un système d'illumination en réflexion (figure 2) basé sur un jeu de filtres et d'un

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

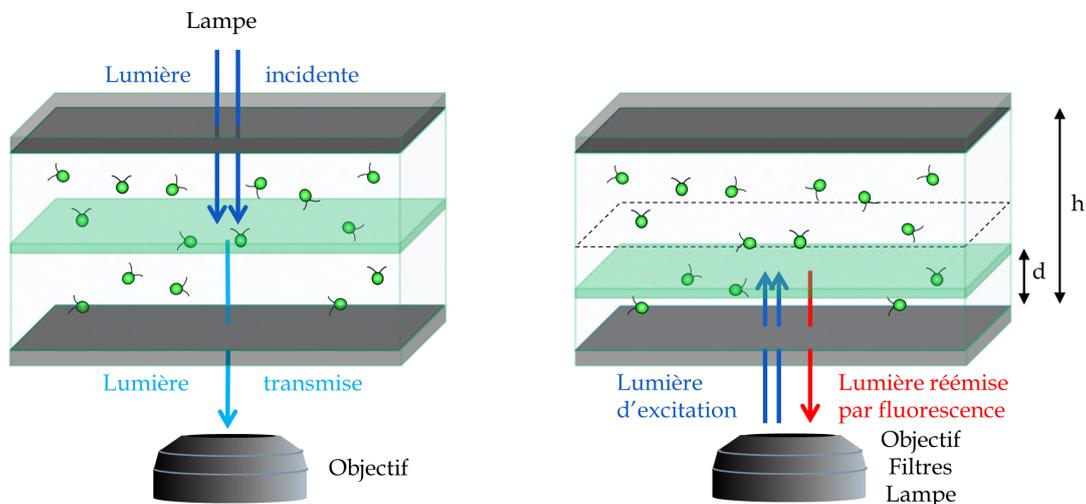


FIGURE 2. Épaisseur d'échantillon traversée par la lumière en imagerie en transmission et en réflexion.

À gauche : Microscopie en transmission : la lumière traverse tout l'échantillon pour former une image. À droite : Microscopie en épifluorescence : la lumière est émise et collectée par l'objectif. Deux filtres et un miroir dichroïque (non représentés) situés sous l'objectif permettent de séparer la lumière provenant de la fluorescence de l'échantillon, de la lumière rétrodiffusée. Avec ce dispositif, rapprocher le plan d'observation de l'objectif permet que la lumière traverse une épaisseur d'échantillon plus faible qu'avec la configuration en transmission. La longueur h est l'épaisseur de l'échantillon et d est la distance entre le plan d'observation et le bas de l'échantillon.

miroir dichroïque (figure 3). La source lumineuse que nous utilisons est une lampe halogène. Sa lumière blanche est filtrée à l'aide d'un filtre passe-bande de manière à garder essentiellement les rayons de longueur d'onde dans la gamme d'excitation (figure 3).

Le miroir dichroïque incliné à 45° par rapport à l'axe du faisceau lumineux incident, réfléchit celui-ci vers la base de l'objectif, qui lui le focalise dans l'échantillon.

Le milieu absorbe une faible partie des rayons incidents et les réémet à sa longueur d'onde d'excitation dans toutes les directions. Il diffuse également les rayons incidents qui continuent pour la plupart dans la direction de l'éclairage. La lumière rétrodiffusée et réémise dans la direction contraire à la direction d'incidence est collectée par l'objectif. Ensuite, la lumière réémise traverse le miroir dichroïque alors que la lumière rétrodiffusée est déviée. La lumière est filtrée à nouveau par le filtre d'émission conçu pour ne laisser passer qu'une gamme de longueur d'onde autour de la longueur d'émission. Elle arrive ensuite sur la surface du détecteur où elle forme l'image des objets fluorescents du plan d'observation.

L'intérêt de se placer dans une configuration en réflexion est tout d'abord d'avoir la possibilité de faire traverser à la lumière une moins grande épaisseur d'échantillon. En effet, en transmission la lumière traverse l'échantillon sur toute son épaisseur h ,

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

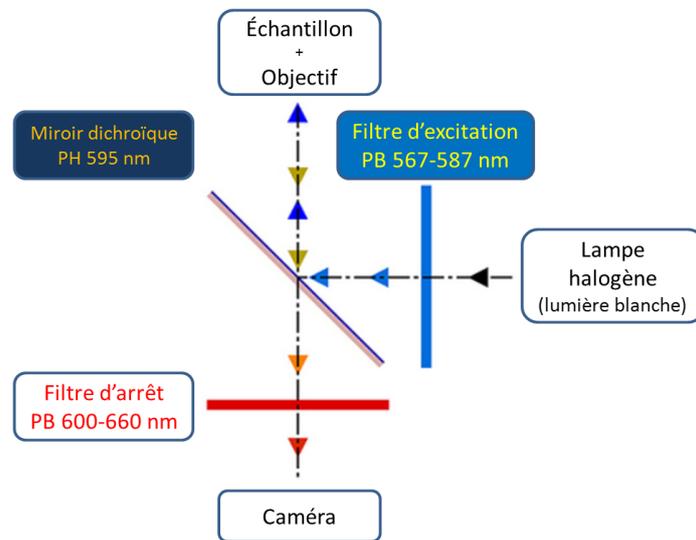
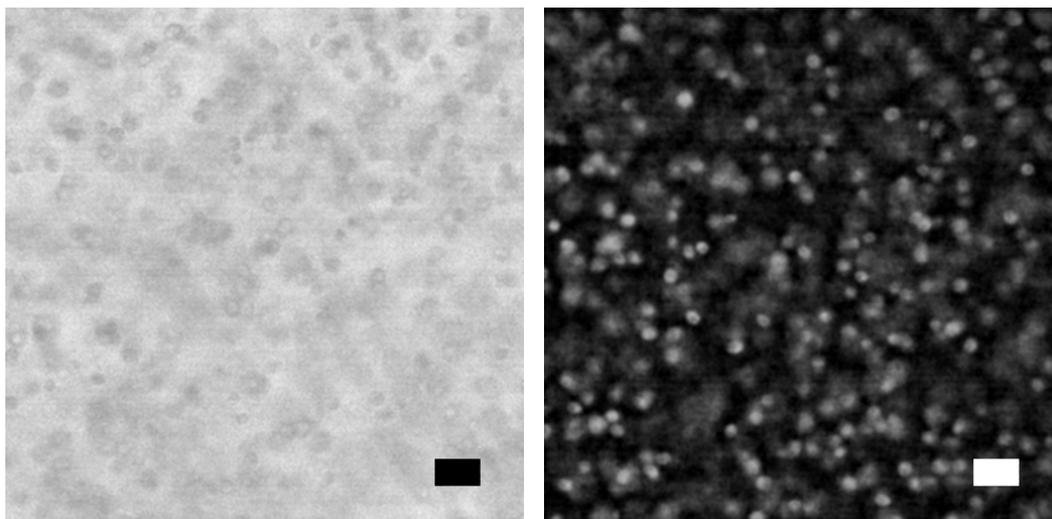


FIGURE 3. Système de deux filtres et un miroir dichroïque utilisé en épifluorescence. Nous avons excité la fluorescence de l'échantillon avec une lumière jaune obtenue à partir d'une lampe halogène filtrée par un filtre passe-bande (longueur d'onde λ telle que $567 \leq \lambda \leq 587$ nm). La lumière d'excitation est réfléchiée par le miroir dichroïque, lequel réfléchit les rayons lumineux de longueur d'onde inférieure à 595 nm et laisse passer les autres. Nous avons récupéré la lumière émise par la fluorescence de la suspension dans le rouge grâce à un deuxième filtre passe-bande ($600 \leq \lambda \leq 660$ nm). « PB » et « PH » signifient respectivement « passe-bande » et « passe-haut ».

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

alors qu'en réflexion et en plaçant le plan d'observation en dessous de la mi-hauteur de l'échantillon ($d < h/2$), la lumière traverse seulement une épaisseur $2d$, inférieure à h (figure 2). Ainsi le chemin lumineux est moins perturbé que dans le cas d'un éclairage en transmission et l'image est moins brouillée (figure 4). Un autre intérêt



(a) Image acquise en champ clair (transmission).

(b) Image acquise en lumière fluorescente (réflexion).

FIGURE 4. Avantage d'un éclairage en réflexion plutôt qu'en transmission dans une suspension semi-diluée. À gauche : image obtenue par un éclairage en transmission. À droite : image obtenue par un éclairage en réflexion grâce à la fluorescence naturelles des *Chlamydomonas Reinhardtii*. L'image obtenue en transmission est plus brouillée que celle acquise en réflexion. En transmission, la lumière traverse toute l'épaisseur de la suspension alors qu'en réflexion, en plaçant le plan d'observation près de l'objectif, on parvient à réduire la distance parcourue par la lumière dans le milieu (figure 2). Pour ces images, la fraction volumique de la suspension était de 2,02 % et un objectif de grossissement x20 a été utilisé. Les inserts de chaque image mesurent tous deux 30 μm de long.

propre à cette technique est l'amélioration du rapport signal sur bruit de l'image obtenue. La lumière parvenant au détecteur étant juste la lumière émise par les objets fluorescents eux mêmes, sans lumière de fond, le rapport signal sur bruit est bien meilleur qu'en microscopie en champ clair [82].

Cette technique présente donc certains avantages par rapport à la technique utilisée auparavant. Malheureusement, elle comporte également quelques désagréments. Le premier désagrément de cette technique est que pour obtenir un signal de fluorescence utilisable, cela demande d'appliquer à l'échantillon une illumination d'intensité bien plus importante que dans le cas d'une illumination en champ clair et en transmission.

Cette contrainte est imposée par la faible efficacité du processus de fluorescence en général. Ceci est lié à l'efficacité quantique du fluorochrome et à son coefficient

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

d'extinction molaire principalement. Les deux doivent être maximums pour un efficacité maximale de la fluorescence. Le rendement quantique est la probabilité qu'un fluorochrome excité réémette un photon par fluorescence, et le coefficient d'extinction molaire mesure la quantité de lumière absorbée par mole de fluorochrome. Il faut donc que les fluorochromes absorbent un maximum de photons et qu'ils soient très efficaces pour les réémettre en fluorescence pour que l'intensité du signal soit la meilleure. Ces deux quantités dépendent du fluorochrome utilisé ainsi que de l'environnement dans lequel il est utilisé (pH, polarité du solvant, température, etc.).

La deuxième raison qui appelle à utiliser une lampe de forte puissance pour illuminer le système est la nécessité de réaliser des images avec une fréquence d'acquisition relativement élevée. Les algues que nous étudions ici se déplacent sur de grandes distances par rapport à leur taille en l'espace d'une seconde. Il faut donc arriver à faire des images rapidement, tout d'abord pour que l'image ne soit pas floue. Ensuite, il faut également pouvoir imager rapidement si l'on souhaite détailler leur dynamique avec précision. Tout cela induit donc un plus grand besoin de lumière que si les algues bougeaient peu. À titre d'exemple, nous avons dû aller jusqu'à une fréquence d'acquisition de 20 images par secondes lors de l'étude de l'échantillon le plus concentré pour les besoins de la reconstruction de trajectoire (comme nous le verrons au paragraphe IV.2.5). Cette fréquence implique un temps maximum d'exposition d'un peu moins de 50 ms, ce qui est court. Cela n'aurait pas été un problème si le signal de fluorescence que nous recevons avait été plus fort.

La quantité de lumière reçue nécessaire à la formation d'une image est évidemment reliée aussi à la sensibilité de la caméra utilisée. Nous avons utilisé la même caméra qu'au chapitre III (PCO Sencicam QE) qui est une caméra sensible refroidie.

Dans le cas de notre étude, cette forte illumination perturbe les *Chlamydomonas Reinhardtii* qui sont négativement phototactiques lorsque l'intensité lumineuse qu'elles reçoivent est trop importante. Des études ont été menées sur ce sujet [36, 60, 35].

La dynamique n'est donc pas exactement la même que celle que l'on pourrait observer dans le cas d'un éclairage en lumière rouge de faible intensité, lumière à laquelle les algues ne sont pas sensibles. Il est possible théoriquement de diminuer cet effet en utilisant un fluorochrome excitable en rouge et en utilisant un éclairage rouge. Nous n'en avons pas trouvé dans cette gamme de longueur d'onde qui soient compatibles avec des cellules biologiques vivantes.

Le deuxième inconvénient de cette technique est directement relié à l'un des principaux avantages qu'elle procure. L'épifluorescence permet de réduire l'épaisseur d'échantillon traversée par la lumière mais cela demande de rapprocher le plan d'observation du bord de l'échantillon. Ce qui fait que l'on n'observe plus exactement la dynamique au centre du capillaire, loin des bords et qu'on risque de voir apparaître des effets liés aux bords.

Dans la pratique, nous sommes restés le plus loin possible des bords. Au plus près, nous étions à une distance du bord du capillaire d'environ 50 μm (soit 5 diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*) au lieu de 100 μm dans le cas dilué. Pour que les algues soit visibles avec cette méthode de microscopie, il faut qu'elles contiennent

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

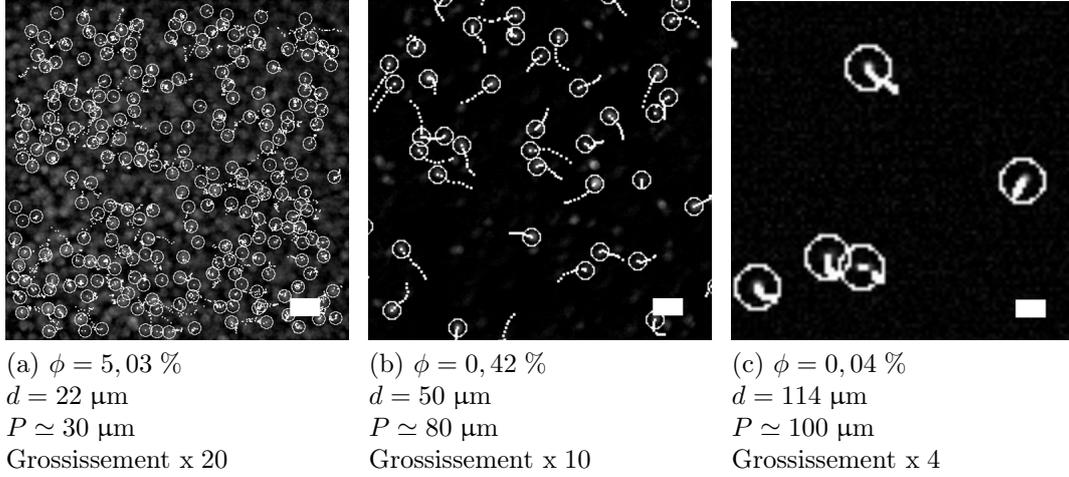


FIGURE 5. Images instantanées du plan d’observation réalisées en épifluorescence à différentes fractions volumiques ϕ de nageurs. La distance moyenne entre deux nageurs correspondante est d . Chaque image a été réalisée avec un grossissement différent. L’insert blanc mesure $30 \mu\text{m}$ de long. La profondeur dans la direction perpendiculaire au plan d’observation sur laquelle une particule est visible est notée P . La trace derrière les particules est leur trajectoire durant les 2 secondes précédant la prise de vue (certaines trajectoires à l’écran sont plus courtes, notamment dans le cas concentré, car certains nageurs sont apparus dans la zone d’observation pendant les 2 secondes précédant l’image).

des molécules fluorescentes. Les *Chlamydomonas Reinhardtii* contiennent de la chlorophylle, ce qui permet de les observer en épifluorescence.

Pour l’éclairage, nous avons utilisé une lampe X-Cite[®] 120 de puissance 120 W dont le spectre d’émission contient un pic à 575 nm (lumière jaune). Nous avons excité la fluorescence de la chlorophylle avec cette lumière car nous souhaitons une lumière de longueur d’onde la plus proche possible du rouge pour éviter au maximum le phototactisme.

Pour obtenir un éclairage jaune à partir du large spectre de la lampe utilisé, nous avons choisi comme filtre d’excitation un filtre passe-bande Chroma[®] de longueur d’onde de centre de bande de 577 nm et de largeur de bande de 20 nm. En prenant un filtre avec une bande passante étroite, nous nous sommes assurés de limiter l’apport en lumière parasite aux algues. Le miroir dichroïque a été choisi tel qu’il soit réfléchissant aux lumières de longueur d’onde inférieures à 595 nm. Le filtre d’émission a été choisi avec une longueur d’onde de centre de bande de 630 nm et de largeur de bande 60 nm afin de collecter un maximum de lumière réémise (figure 3).

Suivant la concentration en algues de l’échantillon analysé, le nombre de nageurs observés à l’écran varie (figure 5). Pour l’analyse de la dynamique de nage, il est préférable que ce nombre ne varie pas trop. Cela permet de calculer des moyennes sur des ensembles de particules de tailles identiques, donc d’avoir la même précision statistique d’un échantillon à l’autre.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

Dans le but d'avoir une concentration fixe en nageurs fluorescents, quelle que soit la concentration en nageurs dans l'échantillon, nous avons essayé de marquer les algues avec un colorant fluorescent. Nous avons tout d'abord marqué les *Chlamydomonas Reinhardtii* avec un premier colorant fluorescent : la rhodamine (Sigma-Aldrich) (protocole en annexe 5). Cela n'a pas fonctionné car le colorant ressort des algues par diffusion en une dizaine de minutes une fois que celles-ci sont placées dans un milieu sans colorant. Ensuite, nous avons essayé la fluorescéine isothiocyanate-dextran (Sigma-Aldrich) (protocole en annexe 5). Il s'agit d'un colorant lié à des molécules de dextran. La présence du dextran aurait dû empêcher les molécules de colorant de ressortir facilement des cellules mais il semble que ce colorant n'ait pas réussi à pénétrer la paroi des cellules. Enfin nous avons essayé le CelltrackerTM Red CMTX (Invitrogen[®]) qui est un colorant qui pénètre dans les cellules puis réagit avec leur environnement interne afin de rester fixé dans la cellule. Ce colorant entre et reste bien dans les cellules mais il les tue (protocole en annexe IV.5).

Aucun des colorants testé n'a permis de marquer durablement les *Chlamydomonas Reinhardtii* en vie. Nous avons donc choisi d'utiliser l'autofluorescence naturelle des *Chlamydomonas Reinhardtii* pour les observer en épifluorescence. Cela ne permet pas de contrôler le nombre de nageurs visibles à l'écran et donc la taille de l'échantillon statistique, mais cela permet tout de même l'observation du système.

2.4 Choix du grossissement de l'objectif pour maximiser la précision de la statistique

Nous venons de voir qu'en utilisant la fluorescence de la chlorophylle présente dans les *Chlamydomonas Reinhardtii* pour les suivre, le nombre de nageurs observés à l'écran allait varier suivant la fraction volumique de la suspension étudiée. Nous avons évoqué précédemment que la précision de la statistique dépendait directement du nombre de nageurs utilisés. Dans l'état actuel de notre système de mesure, la qualité de la statistique va dépendre de la concentration en micro-algues de l'échantillon considéré. Pour contourner cet effet, nous pouvons ajuster les dimensions de la zone d'observation, à savoir la surface de la fenêtre d'observation et la profondeur d'observation. Ainsi, il est possible d'augmenter le nombre de nageurs observés lorsque la concentration diminue ou de le diminuer quand la concentration augmente. Plusieurs modifications du dispositif expérimental peuvent être envisagées pour faire cela.

Pour que la statistique soit la plus précise possible, il faut enregistrer les trajectoires du plus grand nombre de nageurs possible. En diminuant le grossissement de l'objectif, on augmente la taille de la fenêtre d'observation donc le nombre de nageurs observés à l'image. Malheureusement, en réduisant le grossissement, on diminue également la précision avec laquelle on détecte la position d'une particule. La taille des nageurs mesurée en pixels sur l'image ne doit donc pas être trop petite. Pour que la position d'un nageur soit repérable précisément¹ avec la technique de

1. Il est possible d'obtenir des erreurs sur la position de particules inférieures au dixième de pixel pour des images ayant un bon contraste et dont le bruit de fond a été correctement enlevé.

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

détection de particules que nous utilisons, il faut que celui-ci ait un diamètre minimum de 4 à 5 pixels sur une image [11]. Le grossissement minimum dépend donc de la taille des pixels de la caméra utilisée. Avec la caméra PCO Sensicam QE que nous avons utilisé pour cette étude, le grossissement x4 remplissait cette condition (tableau II.1).

Ce grossissement minimum doit satisfaire un autre critère : il doit permettre que les nageurs proches soient discernables. L'image que nous réalisons avec notre système d'observation est la « superposition » des images des plans du volume d'observation. Lorsque l'on augmente la fraction volumique, les images des nageurs situés dans des plans différents se recouvrent de plus en plus fréquemment, rendant l'image de moins en moins exploitable. Pour diminuer cet effet, il est possible de diminuer la profondeur de la zone d'observation à mesure que l'on augmente la concentration en nageurs. Pour cela il suffit d'augmenter le grossissement de l'objectif [6].

Le choix du grossissement minimal à utiliser est donc imposé en régime dilué par la taille minimale des algues en pixel et en régime semi-dilué par la profondeur de champ permettant d'obtenir une image exploitable. Le critère lié à la fraction volumique en nageurs étant plus restrictif que celui de la taille des algues en pixels, le grossissement minimal à utiliser sera plus élevé en milieu semi-dilué qu'en dilué. La profondeur d'observation sera donc moindre dans les régimes les plus concentrés.

Cette augmentation du grossissement minimum avec la fraction volumique entraîne la réduction de la taille de la zone d'observation (fenêtre d'observation et profondeur d'observation). Mais comme la fraction volumique augmente dans le même temps, le nombre de *Chlamydomonas Reinhardtii* présentes dans la zone d'observation varie peu et donc la précision de la statistique varie peu. Le tableau IV.1 récapitule le nombre moyen de nageurs observés sur une image en fonction de la fraction volumique en nageurs et du grossissement utilisé². On observe qu'avec le choix des grossissements qui a été fait, le nombre moyen d'algues dans la zone d'observation reste du même ordre de grandeur.

2.5 Reconstruction de trajectoires

Après la réalisation d'images des nageurs, l'étape restant avant la mesure de la dynamique est la reconstruction des trajectoires. Le procédé dans le cas de suspensions semi-diluées reste le même que dans le cas dilué (cf. chapitre II). Les images sont débarrassées de leur bruit de fond de taille caractéristique d_b en conservant préférentiellement les objets de taille caractéristique D_{\max} . Ces objets sont ensuite détectés par la routine 'feature' et les artefacts détectés avec eux sont éliminés en utilisant un critère de luminosité minimale L_{\min} . Les trajectoires sont ensuite reconstruites à partir des objets détectés en donnant la distance maximale autorisée de déplacement d'un objet entre deux images consécutives Δr_{\max} . Enfin, les particules ou artefacts résiduels immobiles sont éliminés en utilisant le fait qu'ils doivent s'être déplacés d'une distance Δr_{\min} au moins en un temps Δt_{\max} .

2. La technique utilisée pour estimer la profondeur d'observation est développée au paragraphe IV.2.6.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

Grossissement	Profondeur d'observation estimée (μm)	Côté de la fenêtre d'observation carrée (μm)	Nombre moyen d'algues dans la zone d'observation	Fraction volumique (%)	Distance moyenne entre nageurs (μm)
x20	30	335	323	5,03	22
x20	40	335	302	3,53	25
x20	50	335	215	2,02	30
x20	60	335	191	1,49	33
x10	80	661	546	0,82	40
x10	80	661	279	0,42	50
x10	80	661	140	0,21	63
x10	80	661	97	0,15	71
x4	100	1646	344	0,07	92
x4	100	1646	181	0,04	114

TABLE IV.1. Grandeurs caractéristiques de la statistique en fonction de la fraction volumique et du grossissement utilisé.

Les modifications apportées par la spécificité de l'étude d'une suspension semi-diluée sont les suivantes. Le pré-traitement des images et la partie détection des particules restent les mêmes, à ceci près qu'il faut ajuster les paramètres dépendant de la taille des objets recherchés (taille caractéristique des images des algues D_{\max} et luminosité numérique minimale de l'image d'un objet détecté L_{\min}) puisqu'elle change avec le grossissement de l'objectif utilisé. La taille des objets est également modifiée du fait de la diminution de la qualité de l'image obtenue liée à l'augmentation de la densité d'objets rencontrés par la lumière dans la suspension.

La reconstruction des trajectoires à partir des positions suit le même principe qu'au paragraphe II.4. Les propriétés des trajectoires reconstruites sont quant à elles modifiées. Tout d'abord, la durée moyenne des trajectoires reconstruites raccourcit avec l'augmentation de la concentration et du grossissement de l'objectif utilisé (figure 6). Cela est dû en partie à l'augmentation de la fréquence de croisement des nageurs qui entraîne bien souvent la coupure d'une des deux trajectoires (voire des deux) après rencontre. Les trajectoires réelles sont ainsi découpées en trajectoires plus courtes, ce qui diminue le nombre d'évènements contribuant au calcul de statistiques aux temps longs. La diminution de la durée moyenne des trajectoires est également due à la diminution de la profondeur de champ avec l'augmentation du grossissement de l'objectif. Les nageurs disparaissent plus souvent de la zone d'observation donc on les perd plus souvent à l'étape de détection et leurs trajectoires reconstruites sont plus courtes.

Le risque d'échange de particules après un croisement augmente avec la concentration. Cela est lié à l'augmentation de la fréquence de croisement des particules. En pratique, cela arrive peu car l'algorithme développé par John Crocker et David Grier [10] fonctionne bien tant que la distance moyenne entre particules reste environ

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

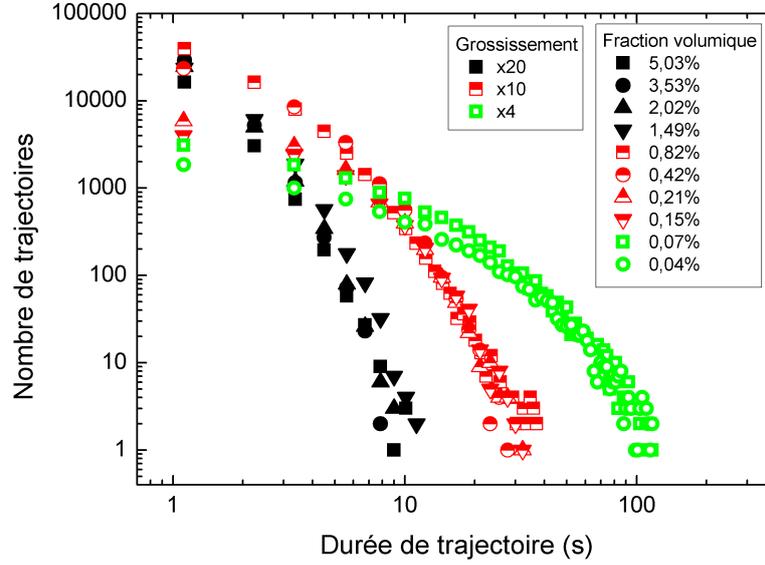


FIGURE 6. Histogramme du nombre de trajectoires reconstruites en fonction de leur durée

le double de la distance parcourue par un objet entre deux images. Ainsi, la fréquence d'acquisition minimale à laquelle doit être utilisée la caméra est celle pour laquelle les nageurs se déplacent au maximum de la moitié de la distance moyenne séparant deux nageurs. L'imagerie optique nous limite à une concentration maximale pour laquelle la distance moyenne entre particules d_{min} est de l'ordre de deux diamètres soit une vingtaine de microns. Les *Chlamydomonas Reinhardtii* se déplacent à une vitesse maximale V_{max} d'environ $50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. La fréquence minimale d'acquisition f_{min} est donnée par :

$$f_{min} = \frac{V_{max}}{d_{min}/2} \simeq 5 \text{ s}^{-1} \quad (\text{IV.1})$$

En pratique, nous avons utilisé une fréquence d'acquisition sept fois plus élevée que le f_{min} pour minimiser les possibilités d'erreurs de reconstruction lors des croisements de particules.

La dernière conséquence que l'on peut observer est la diminution du nombre de particules immobiles visibles en régime semi-dilué par rapport au cas dilué. Cela est dû à la réduction de la profondeur de champ principalement car les particules immobiles sont celles qui se retrouvent proches des parois du capillaires.

2.6 Gamme d'étude de la fraction volumique

2.6.1 Fraction volumique et distance moyenne inter-nageurs

Nous avons préparé les échantillons de telle sorte que la gamme d'observation de la fraction volumique soit la plus étendue possible. Pour obtenir une statistique suffisamment précise en régime dilué, il faut avoir enregistré un certain nombre de trajectoires. Or le nombre de trajectoires diminuant avec la concentration, il arrive

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

un moment où même si l'on diminue le grossissement de l'objectif pour augmenter la taille de la fenêtre d'observation, le nombre de cellules nageant dans cette fenêtre pendant le temps d'acquisition ne permet pas d'obtenir une statistique suffisamment fiable, ou alors cela demande des temps d'observation longs, pour lesquels le système ne peut plus être considéré dans un état stationnaire.

Nous avons donc étudié dans le cas le plus dilué une suspension de fraction volumique ϕ_{min} égale à 0,04 % (figure 5), soit une distance moyenne entre deux nageurs d'environ onze diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*. Nous avons réalisé cette mesure à l'aide d'un objectif de grossissement $\times 4$ et avec une profondeur d'observation mesurée de 100 μm , soit la moitié de la profondeur de l'échantillon.

Dans le cas le plus concentré, la suspension que nous avons étudiée avait une fraction volumique ϕ_{max} de 5,03 %, soit une distance moyenne entre nageurs de deux diamètres de cellule environ (figure 5). Nous avons, pour cette mesure, utilisé un objectif de grossissement $\times 20$ et la profondeur d'observation que nous avons mesuré à cette concentration est de l'ordre de 30 μm . Nous avons placé le plan d'observation le plus éloigné possible du bord de l'échantillon pour minimiser les effets de bord, tout en obtenant des images analysables. À cette fraction volumique, le plan d'observation était situé à une distance de 50 ± 5 μm du bord de l'échantillon. Au delà de cette valeur de concentration, il n'était plus possible de distinguer les nageurs correctement.

2.6.2 Évolution temporelle de la fraction volumique sous éclairage important

Lorsque l'on éclaire les *Chlamydomonas Reinhardtii* en lumière fluorescente, on observe une variation de la concentration locale dans le champ d'illumination au cours du temps.

Cette variation de concentration s'explique par l'intensité de la lumière à laquelle nous soumettons les *Chlamydomonas Reinhardtii*. En effet, ces algues sont phototactiques et bien que nous les éclairions dans une gamme de longueurs d'onde auxquelles elles sont relativement peu sensibles (proche rouge), elles ressentent tout de même la forte intensité lumineuse à laquelle nous les soumettons.

Dans l'étude de la dynamique en régime concentré, nous nous sommes placés en situation stationnaire. Nous avons attendu que la concentration en *Chlamydomonas Reinhardtii* à l'écran et la vitesse moyenne de ces algues se stabilisent et nous avons effectué les mesures.

2.6.3 Méthode de comptage

Nous avons vu au chapitre II comment évaluer la fraction volumique d'une culture de *Chlamydomonas Reinhardtii*. Comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, lors de l'observation de la suspension en lumière fluorescente, la fraction volumique varie au cours du temps lorsque la suspension se retrouve éclairée par une source lumineuse jaune à cause de la sensibilité des algues à la lumière (figure 7).

2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

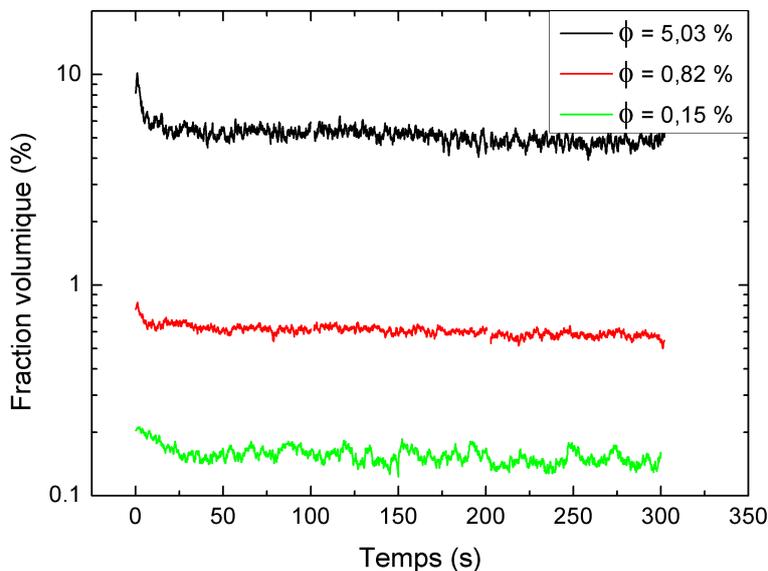


FIGURE 7. Évolution de la fraction volumique mesurée au cours du temps sous éclairage fluorescent. L'échantillon commence à être éclairé en lumière jaune à l'instant $t = 0$. Trois courbes d'évolution de fractions volumiques différentes sont présentées. La modification de la fraction volumique de sa valeur initiale à celle qu'elle atteint à l'équilibre est d'autant moins importante que la fraction volumique est moins élevée.

Il faut donc que la mesure de la concentration locale soit réalisée pendant l'éclairage en fluorescence. De plus, on devra faire la mesure pour chaque concentration étudiée car même si l'on connaît les relations entre les valeurs des concentrations des suspensions au repos, rien ne garantit que ces relations soient valables pour les concentrations des échantillons soumis à un éclairage fluorescent.

Mesurer la concentration pendant l'éclairage fluorescent est une chose simple en théorie. Il suffit de compter le nombre de cellules présentes à un instant dans la zone d'observation et de diviser ce nombre par le volume de la zone d'observation. Le nombre de cellules présentes dans ce volume est facilement mesuré grâce à la phase de détection de particules du procédé de reconstruction de trajectoires.

La difficulté réside dans la mesure de la profondeur d'observation. Cette profondeur va dépendre de l'objectif utilisé et de la concentration en nageurs dans l'échantillon (tableau IV.1). Pour estimer cette grandeur, on peut mesurer le nombre de nageurs dans la zone d'observation juste au moment où l'on allume la lampe fluorescente. À cet instant, l'échantillon ayant été laissé au repos dans le noir pendant quelques minutes avant l'éclairage, la concentration de la suspension est homogène dans l'échantillon et sa valeur est la concentration de repos. En déterminant en parallèle la concentration de la culture au repos par la méthode présentée au paragraphe II.2 sur une partie de la suspension non utilisée pour la mesure, on peut remonter à la profondeur d'observation pour cette valeur de concentration.

Avec l'exposition à la lumière fluorescente, la concentration va diminuer à mesure

que les algues s'éloignent du centre lumineux, jusqu'à arriver à une concentration stable au bout d'une durée d'une minute trente environ (figure 7). À ce moment là, en recomptant le nombre de nageurs à l'écran et en le rapportant au volume de la zone d'observation que l'on a déterminé, on a une mesure de la concentration en nageurs dans cet échantillon en éclairage fluorescent en régime stationnaire.

3 Dynamique de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii* en suspension semi-diluée

Nous avons vu au chapitre III que la dynamique de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii* en régime dilué, lorsqu'elle est observée à une échelle de temps supérieure au temps moyen d'un battement de flagelles, peut être décrite par une marche aléatoire avec persistance avec des caractéristiques particulières. En plus des réorientations aléatoires survenant au terme d'un mouvement dirigé d'une durée de quelques secondes, la cellule présente un mouvement de nage hélicoïdal pendant la phase balistique.

Nous étudions ici les effets de la dynamique collective sur les caractéristiques de la marche aléatoire que réalise les algues, en vue d'obtenir des informations concernant les mécanismes d'interaction entre nageurs en fonction de leur fraction volumique. Nous cherchons également à déterminer si des mouvements collectifs peuvent exister dans des suspensions de micro-nageurs de type « puller ». Nous nous intéressons aux effets de la variation de la fraction volumique en nageurs sur les deux composantes de la dynamique de nage. La partie déplacement est sondée via le déplacement quadratique moyen et les distributions de module de vitesse. La partie orientation est mesurée à l'aide de la fonction d'autocorrélation de direction.

3.1 Dynamique d'orientation des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*

A l'instar du chapitre III, nous utilisons la fonction d'autocorrélation de direction des nageurs pour obtenir les temps caractéristiques de la dynamique angulaire. Rappelons la définition de cette fonction de corrélation :

$$C(\tau) = \langle \mathbf{e}(t + \tau) \cdot \mathbf{e}(t) \rangle = \langle \cos(\theta(\tau)) \rangle \quad (\text{IV.2})$$

avec :

- $\mathbf{e}(t)$ le vecteur unitaire direction de déplacement instantané à l'instant t donné par $\mathbf{e}(t) = \frac{\mathbf{v}(t)}{|\mathbf{v}(t)|}$ avec $\mathbf{v}(t)$ son vecteur vitesse instantané.
- $\theta(\tau)$ l'angle entre les directions de déplacement de l'objet aux instants t et $t + \tau$.
- $\langle . \rangle$ la moyenne temporelle sur tous les instants et la moyenne d'ensemble sur toutes les particules.

Lors de l'étude de la dynamique de nage individuelle à des échelles de temps supérieures à la durée d'un battement de flagelles et en suspension diluée, nous

3. DYNAMIQUE DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

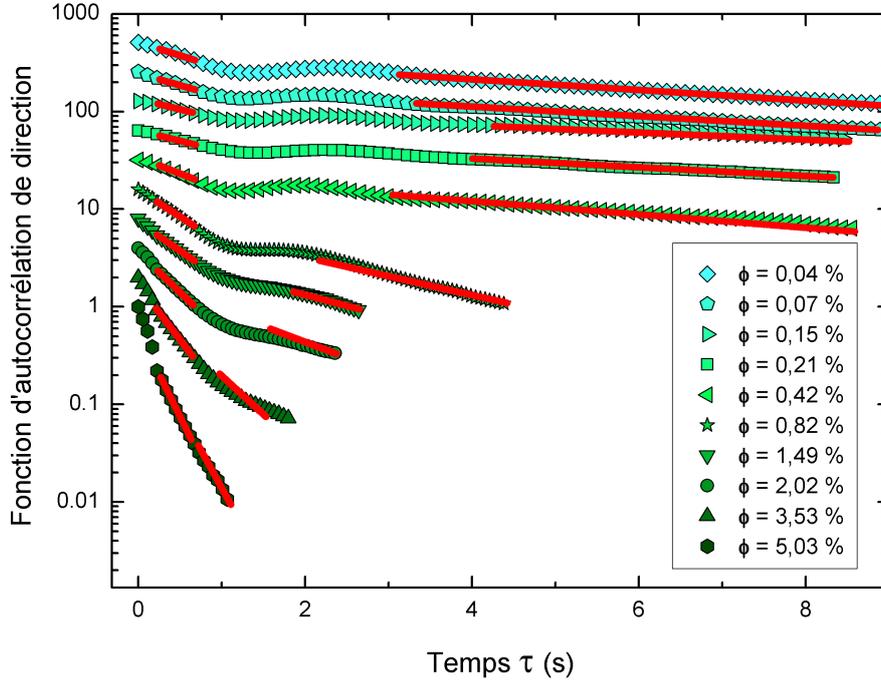


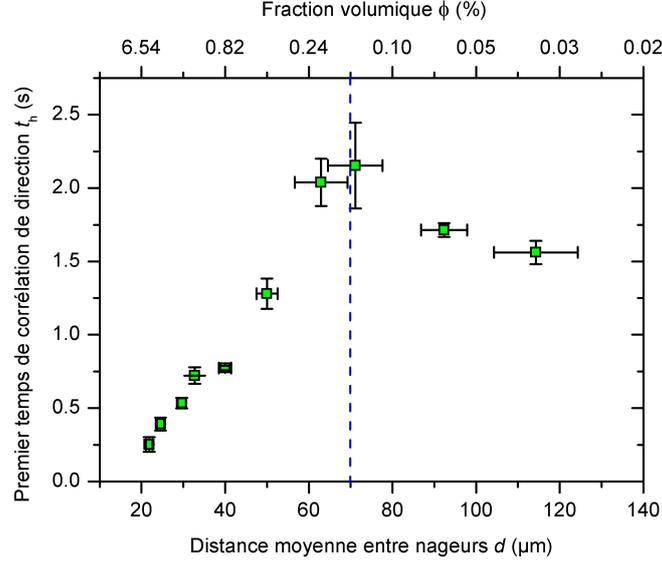
FIGURE 8. Fonctions d'autocorrélation de direction mesurées à différentes fractions volumiques ϕ . On observe les deux parties décroissant exponentiellement pour chaque courbe. Les courbes sont décalées entre elles de manière logarithmique par un facteur deux pour plus de visibilité. Les ajustements par des fonctions exponentielles décroissantes pour l'obtention des temps de corrélations de direction t_h et t_a sont superposés aux points expérimentaux. Nous observons que le premier temps de corrélation (première pente) croît avec la fraction volumique puis décroît légèrement pour les deux suspensions les plus diluées. Le deuxième temps de corrélation t_a (deuxième pente) suit la même tendance. Au dessus d'une fraction volumique de 3,53 %, l'ajustement de la deuxième partie de la courbe par une fonction exponentielle décroissante commence à ne plus être pertinent. Pour ces fractions volumiques, le temps t_a doit être interprété avec précaution.

avons vu que le comportement de $C(\tau)$ pouvait être décrit par une première fonction exponentielle décroissante $e^{-\tau/t_h}$ pour des temps τ inférieurs à t_h et par une deuxième fonction exponentielle décroissante $e^{-\tau/t_a}$ pour des temps τ supérieurs à t_h [51], avec t_h et t_a les deux temps de corrélation de direction.

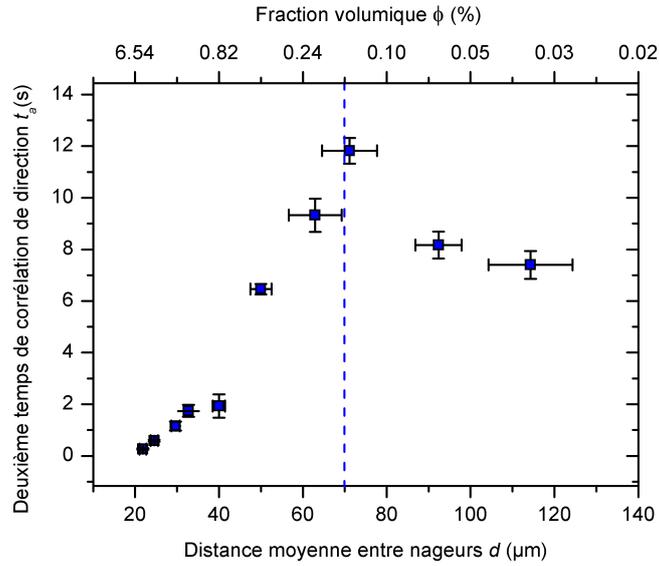
Nous avons mesuré les fonction d'autocorrélation de direction dans des suspensions à différentes fractions volumiques (figure 8). À partir de ces courbes, nous avons mesuré t_h et t_a (figure 9a et 9b) selon la méthode que nous venons d'évoquer, en ajustant les points expérimentaux par deux fonctions exponentielles décroissantes. Ces temps sont représentés en fonction de la distance moyenne inter-nageurs d .

On observe que ces deux temps caractéristiques présentent deux régimes de comportement. Le changement de régime a lieu lorsque la distance moyenne inter-nageurs est de l'ordre de $70 \mu\text{m}$ ($\phi = 0,15\%$), soit environ 7 diamètres de *Chlamydo-*

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE



(a) Premier temps de corrélation angulaire t_h .



(b) Deuxième temps de corrélation angulaire t_a .

FIGURE 9. Temps de corrélation t_h et t_a mesurés à partir de la fonction d'autocorrélation de direction en fonction de d . On observe une distance moyenne caractéristique d_c de l'ordre de $70 \mu\text{m}$ au moment du changement de comportement de t_h et t_a , soit environ 7 diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii* (fraction volumique de l'ordre de 0,15 %). Pour des valeurs de d supérieures à d_c (régime dilué), t_h et t_a sont pratiquement constants. Pour des valeurs de d inférieures (régime semi-dilué), t_h et t_a décroissent. À la transition, les deux temps augmentent brusquement.

3. DYNAMIQUE DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

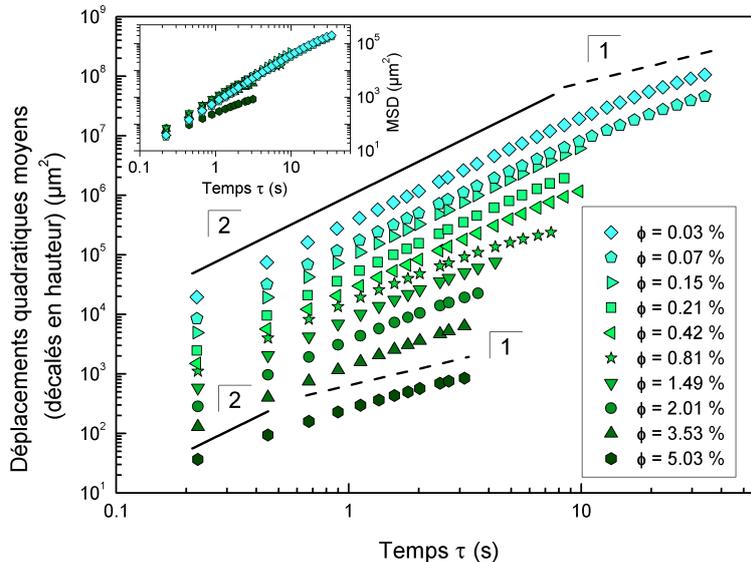


FIGURE 10. Déplacements quadratiques moyens (MSD) à différentes fractions volumiques ϕ . Les MSD sont décalés logarithmiquement en hauteur pour une meilleure visibilité de la variation du temps de réorientation aléatoire t_a . Les lignes pleines représentent une pente de deux (régime balistique) et les lignes pointillées une pente de un (régime de marche aléatoire). Le temps t_a à partir duquel le régime de marche aléatoire commence, diminue lorsque la fraction volumique augmente. *Insert* : Les MSD originaux. On observe que la vitesse balistique v_a semble peu varier avec la fraction volumique sauf dans le cas le plus concentré.

monas Reinhardtii. Dans le régime le plus dilué les temps de corrélations angulaires sont constants. À la transition ils augmentent, puis dans le régime plus concentré ces temps décroissent avec d . On observe que l'ajustement par une fonction exponentielle réalisé sur la fonction d'autocorrélation de direction ne fonctionne plus très bien lorsque la fraction volumique dépasse 3,53 %. Pour ces fractions volumiques, le temps t_a doit être interprété avec précaution.

3.2 Mesure des vitesses

3.2.1 Vitesse balistique

Nous avons mesuré les déplacements quadratiques moyens (MSD) en fonction de la fraction volumique (figure 10). On observe que la forme des courbes de déplacement quadratique moyen change peu en fonction de la fraction volumique. Leur durée est réduite à cause de la diminution de la durée moyenne des trajectoires reconstruites avec l'augmentation de la fraction volumique. On note que le temps τ auquel le régime de marche aléatoire ($\langle r^2(\tau) \rangle \propto \tau$) commence, diminue avec la distance moyenne inter-nageurs.

La vitesse balistique v_a (figure 11) est obtenue en ajustant sur les déplacements quadratiques moyens mesurés, la fonction donnée par le modèle de marche aléatoire

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

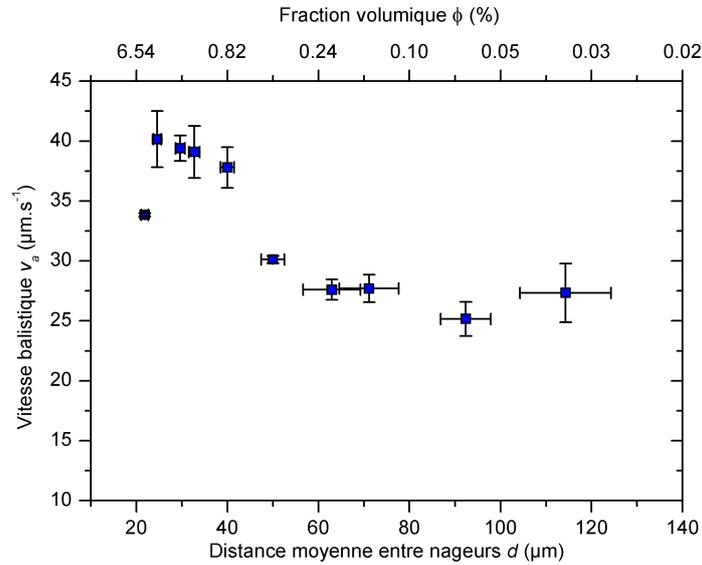


FIGURE 11. Vitesse balistique v_a en fonction de la distance moyenne inter-nageurs d . La vitesse est constante dans le régime dilué puis pour une valeur de d proche de $50 \mu\text{m}$, elle croît avec la diminution de la distance entre les nageurs. Elle diminue brusquement dans le régime le plus concentré.

avec persistance :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = (v_a t_a)^2 \left(\frac{\tau}{t_a} - \frac{1}{2} [1 - e^{-2\tau/t_a}] \right) \quad (\text{IV.3})$$

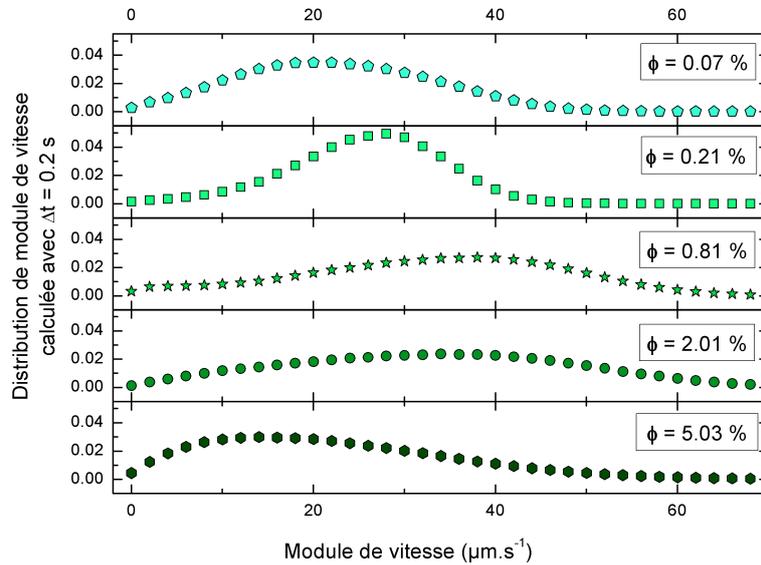
On utilise le temps t_a obtenu précédemment pour la valeur du paramètre t_a pour permettre à l'ajustement de converger. La vitesse balistique augmente lorsque l'on diminue la distance moyenne inter-nageurs puis diminue brusquement pour des fractions volumiques élevées. La distance moyenne inter-nageurs à partir de laquelle v_a se met à augmenter ($d \simeq 50 - 60 \mu\text{m}$) semble un peu plus élevée que celle de la transition observée pour les temps de corrélation.

3.2.2 Distributions de module de vitesse

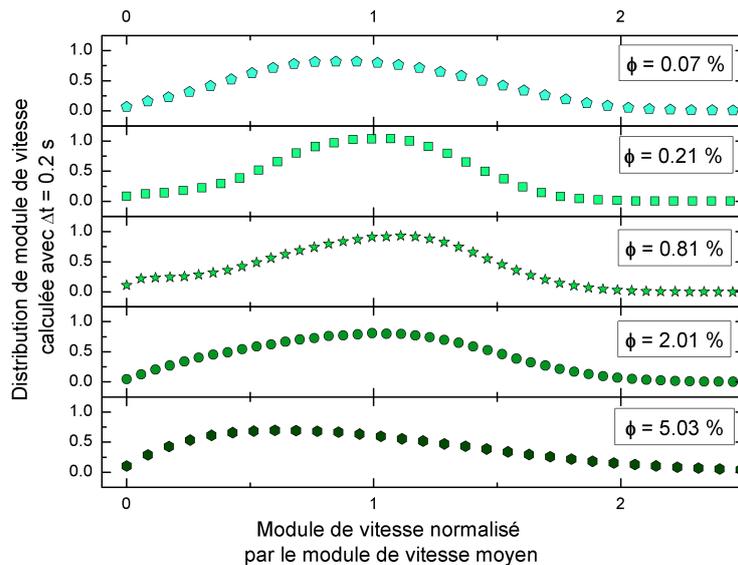
Nous avons mesuré les distributions de module de vitesse $|v|$ en fonction de la fraction volumique (figure 12). On note que la forme des distributions change lorsque varie la fraction volumique. Pour des fractions volumiques élevées, la distribution s'est élargie par rapport au cas dilué.

Si l'on étudie le module de vitesse moyen $\overline{|v|}$ des nageurs (figure 13b), celui-ci est constant lorsque la suspension est diluée. Il augmente dans la même zone de transition que la vitesse balistique v_a puis diminue lorsque d devient supérieure à la valeur de ce seuil. Le module de vitesse le plus probable $\widehat{|v|}$ mesuré comme l'abscisse de la valeur la plus haute de la distribution (figure 13a), évolue avec la même tendance que $\overline{|v|}$ mais l'amplitude de son évolution est plus importante.

3. DYNAMIQUE DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE



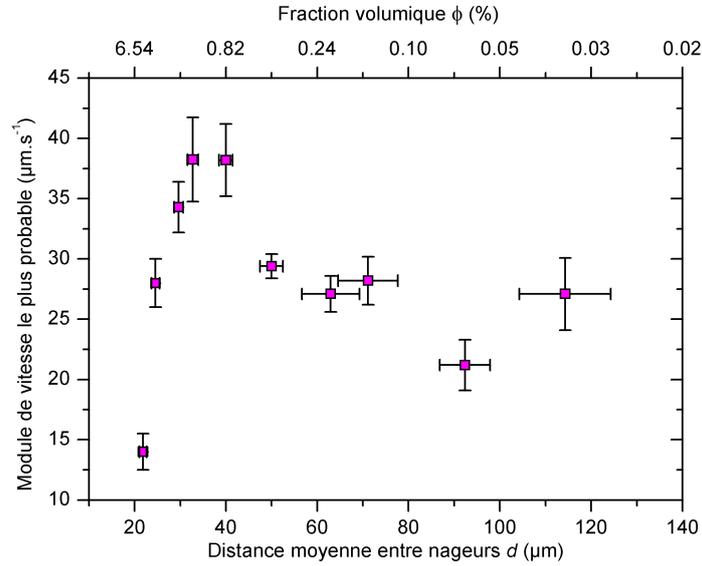
(a) Distribution de module de vitesse $|v|$.



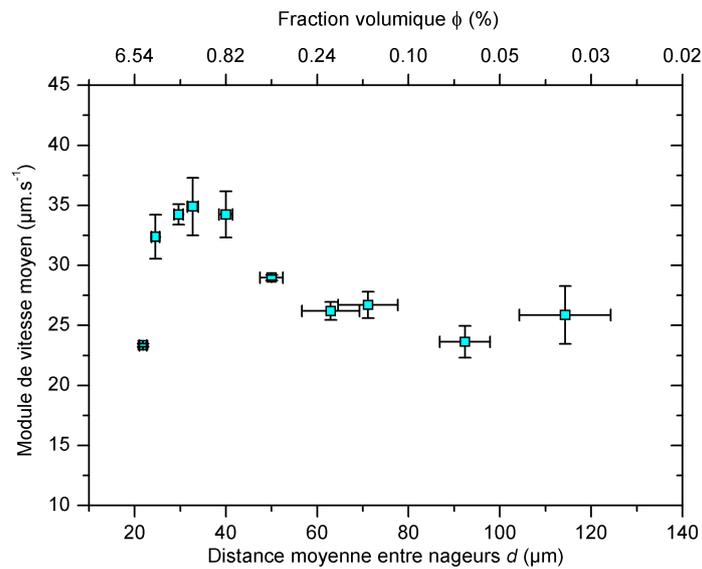
(b) Distribution de module de vitesse normalisée par le module de vitesse moyen $\overline{|v|}$.

FIGURE 12. Distribution de module de vitesse à différentes fractions volumiques. À gauche : les distributions de module de vitesse $|v|$. La valeur du module de vitesse le plus probable $\widehat{|v|}$ (abscisse du pic de la distribution) se déplace avec la fraction volumique. À droite : les mêmes distributions normalisées par leur module de vitesse moyen $\overline{|v|}$. La forme des distributions change avec la fraction volumique, elles s'élargissent à mesure que la distance moyenne inter-nageurs se réduit. Le temps Δt est le laps de temps séparant deux positions, utilisé pour le calcul de la vitesse entre ces points.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE



(a) Module de vitesse le plus probable.



(b) Module de vitesse moyen.

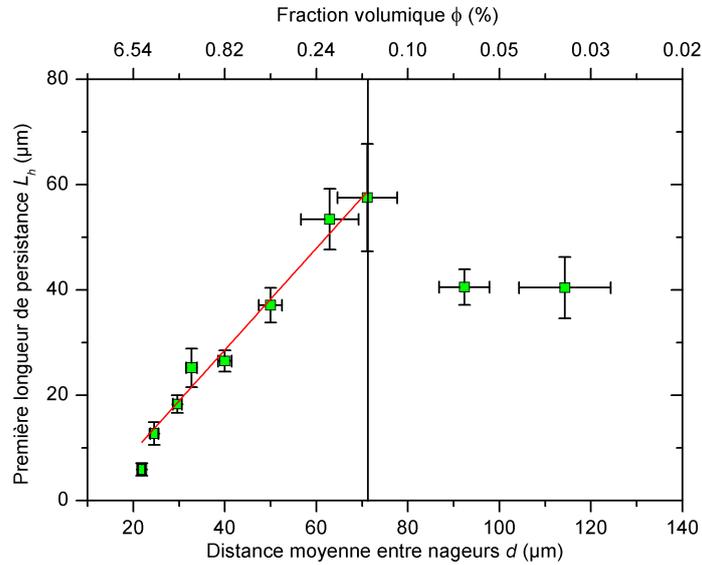
FIGURE 13. Module de vitesse le plus probable $\widehat{|v|}$ et module de vitesse moyen $\overline{|v|}$. Les échelles des deux figures sont les mêmes que celle de la figure 11 pour faciliter la comparaison. $\overline{|v|}$ suit la même évolution que $\widehat{|v|}$. L'évolution de $\widehat{|v|}$ et $\overline{|v|}$ est différente de celle de v_a dans la partie la plus concentrée, v_a diminue peu par rapport à $\overline{|v|}$ et $\widehat{|v|}$.

3. DYNAMIQUE DE NAGE DES *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

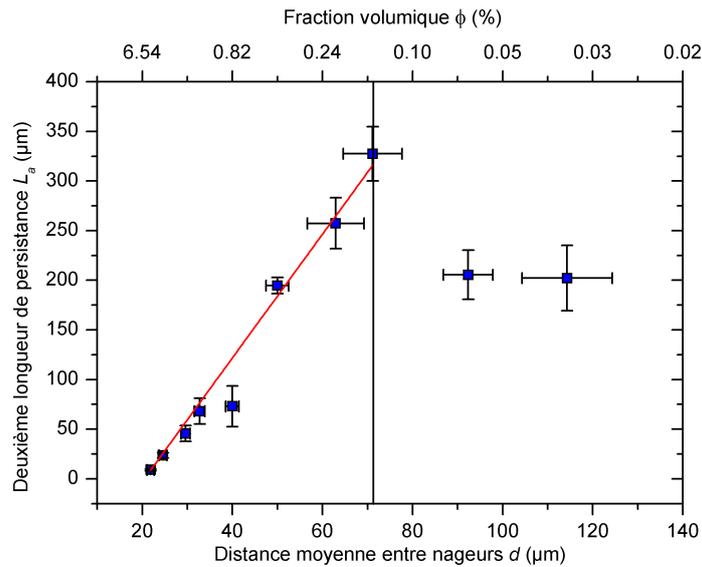
3.3 Longueurs de persistance et distance moyenne inter-nageurs

À partir de la vitesse moyenne entre réorientations aléatoires v_a et des deux temps de corrélation de direction t_h et t_a que nous avons obtenus aux paragraphes précédents, nous pouvons calculer deux longueurs de persistance l_h et l_a (figure 14). La longueur l_h est la distance parcourue par l'algue suivant la direction de déplacement moyenne au cours d'une rotation hélicoïdale. La grandeur l_a est la distance moyenne parcourue entre deux changements de direction de déplacement principale. Nous utiliserons ces longueurs dans la suite pour les comparer au paramètre de notre étude : la distance moyenne inter-nageurs d . L'évolution des longueurs de persistance que l'on mesure est similaire à celle des temps de corrélations correspondants. Ils sont constants dans le régime le plus dilué et lorsque la distance moyenne inter-nageurs est de l'ordre de sept diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, ils augmentent soudain. Ils diminuent ensuite avec la distance moyenne inter-nageurs d et tendent vers zéro. On observe pour les longueurs de persistance que la décroissance dans le régime semi-dilué est linéaire avec d .

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE



(a) Première longueur de persistance l_h .



(b) Deuxième longueur de persistance l_a .

FIGURE 14. Longueurs de persistance l_h et l_a en fonction de la distance moyenne inter-nageurs d . La longueur l_h est le produit de t_h et de la vitesse balistique v_a . Il s'agit de la distance moyenne parcourue par un nageur dans sa direction de déplacement moyenne pendant une rotation hélicoïdale. La longueur l_a est définie comme le produit de t_a et v_a . Il s'agit de la distance moyenne séparant deux réorientations aléatoires. Ces longueurs de persistance évoluent de la même manière que les temps de corrélation dont elles sont issues. La distance moyenne inter-nageurs à laquelle a lieu la transition de comportement est de l'ordre de $70 \mu\text{m}$ (environ 7 diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, soit une fraction volumique de 0,15 %). Lorsque d est supérieure à d_c (régime dilué), l_h et l_a sont constantes. En dessous de d_c (régime semi-dilué), elles décroissent linéairement. Les droites superposées aux données sont des ajustements affines des points expérimentaux dans la zone semi-dilué.

4 Discussion

4.1 Distance moyenne inter-nageurs à la transition entre les deux régimes de comportement des temps de corrélation de direction

Les deux temps de corrélation angulaire que nous avons mesurés en fonction de la fraction volumique présentent deux régimes de comportement (figure 9). Dans le régime le plus dilué, les temps de corrélation angulaire sont constants alors que dans le régime semi-dilué, ils décroissent avec la distance moyenne inter-nageurs. Le changement de régime a lieu lorsque la distance moyenne inter-nageurs est de l'ordre de $70\ \mu\text{m}$ ($\phi = 0,15\ \%$), soit environ 7 diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*.

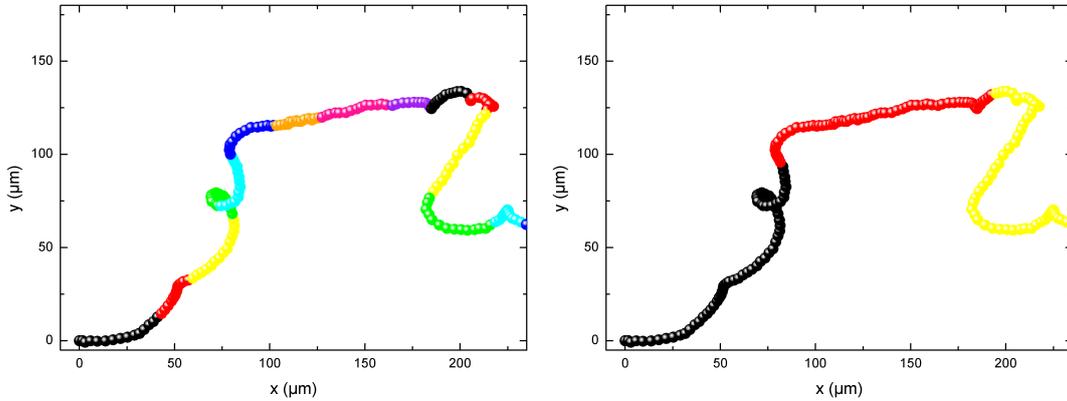
Drescher et al. [16] ont mesuré expérimentalement que le module du champ de vitesse moyen créé par une *Chlamydomonas Reinhardtii* devenait inférieur à 1 % de la vitesse moyenne de déplacement de ce nageur à une distance de son centre de l'ordre de 7 rayons. On peut estimer que cette valeur représente un « rayon hydrodynamique » R_h délimitant l'extension spatiale du champ de vitesse généré par une cellule autour d'elle lors de son déplacement. La transition que l'on observe a lieu lorsque la distance de séparation moyenne entre deux nageurs est telle que les champs de vitesse de ces nageurs sont juste en contact (en considérant que le champ de vitesse a une extension de 7 rayons). Cette observation suggère fortement que la modification du comportement des nageurs vers le régime concentré est liée à des interactions hydrodynamiques entre eux.

4.2 Identification des temps de corrélation obtenus en fonction de la fraction volumique dans le régime dilué

Lors de l'étude de la dynamique en milieu dilué au chapitre III, nous avons vu que le premier temps de corrélation t_h que nous mesurons dans la fonction d'autocorrélation de direction était lié à la durée de rotation hélicoïdale d'une *Chlamydomonas Reinhardtii* autour de son axe de déplacement moyen pendant une course balistique.

Pour le vérifier, nous avons représenté une trajectoire typique que nous avons reconstruite dans le régime dilué (figure 15a). Nous avons illustré ce premier temps de corrélation en modifiant la couleur des points de la trajectoire à partir de chaque instant multiple de ce temps. Nous observons sur cette figure que t_h représente la durée d'une rotation hélicoïdale, comme nous l'avons observé au chapitre III. Pour identifier t_a , nous avons procédé de la même manière (figure 15b). Nous voyons qu'à l'instar du chapitre III, ce temps de corrélation est de l'ordre de la durée caractéristique t_a séparant deux réorientations aléatoires de micro-algue. La durée séparant deux réorientations aléatoires successives varie au cours du temps. Cela fait qu'elle ne correspond pas toujours exactement à la durée moyenne t_a .

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE



(a) Illustration du temps de corrélation t_h . (b) Illustration du temps de corrélation t_a .

FIGURE 15. Trajectoire typique pour une suspension de fraction volumique 0,07 %. Chaque portion de trajectoire d'une couleur dure un temps égal à l'un des deux temps caractéristiques, suivant la figure. À gauche : durée d'une couleur $t_h = 1,71$ s. À droite : durée d'une couleur $t_a = 8,17$ s. On observe que t_h correspond au temps de rotation hélicoïdal t_h et que t_a correspond au temps de réorientation aléatoire t_a , comme nous l'avons observé au chapitre III.

4.3 Comparaison des temps de corrélation en régime dilué avec ceux mesurés au chapitre précédent

Comparons maintenant ces temps de corrélation avec ceux que nous avons mesurés au chapitre III. Pour la suspension sans dextran et de fraction volumique de l'ordre de 0,05 %, le temps de rotation hélicoïdal t_h des algues était de l'ordre de 1,5 s et le temps de réorientation aléatoire de l'ordre de 3 s. Dans le cas dilué de l'étude que nous menons dans ce chapitre, le premier temps de corrélation t_h est de l'ordre de 1,5 s et le deuxième t_a est de l'ordre de 8 s. Les premiers temps de corrélation sont donc en accord, mais les seconds ne le sont pas. Ce phénomène s'explique par les états différents dans lesquels étaient les cellules lorsque nous avons conduit les deux études.

Au chapitre III, les algues étaient éclairées avec une lumière rouge de faible intensité. Dans ces conditions, la dynamique de nage des cellules est celle que l'on pourrait observer dans le noir. Dans le chapitre actuel, les algues ont été fortement illuminées avec une lumière fluorescente dans une gamme de longueur d'onde qu'elles arrivent à percevoir. Elles étaient donc ici dans une situation de phototactisme négatif. Dans ce cas là, les trajectoires des algues sont beaucoup plus dirigées que dans le noir, leur permettant de se déplacer à l'opposé de la direction de la source lumineuse. C'est pour cela que le temps entre les réorientations aléatoires des cellules est bien plus long dans ce chapitre. Le fait que le temps de rotation hélicoïdal ne soit pas modifié suggère que la forme que prennent les flagelles au cours d'un mouvement de battement ne change pas significativement lorsque la cellule passe en mode de nage phototactique. Il a déjà été observé une modification radicale de

4. DISCUSSION

la manière de nager des algues en cas d'exposition à une lumière très forte [56]. L'algue fait onduler ses flagelles de sorte qu'au lieu de nager vers l'avant, elle nage en marche arrière. En pratique, ce type de mécanisme de nage se déclenche surtout au moment du changement brusque de luminosité (par exemple à l'allumage de la lampe fluorescente du microscope) et ne dure pas très longtemps. Après un temps d'éclairage d'environ deux minutes, ce type de moyen de locomotion n'est plus visible dans la suspension.

Les valeurs des vitesses v_a mesurées au chapitre III sont également différentes de celles que nous avons mesurées ici. En régime dilué et en éclairage ne générant pas de réponse photophobique, la vitesse moyenne entre deux réorientations aléatoires était de l'ordre de $50 \mu\text{ms}^{-1}$. Avec l'éclairage de couleur jaune et de forte intensité que nous avons utilisé dans ce chapitre, la vitesse v_a est plutôt de l'ordre de $25 \mu\text{ms}^{-1}$ dans le régime dilué. Une explication pourrait être que la lumière a fortement perturbé les cellules et que leur mécanisme de nage en zigzags en a été modifié. On peut imaginer par exemple que l'intensité lumineuse ait pu entraîner une saturation des récepteurs de lumière de la cellule et des canaux d'activation de la réponse de fuite qui aurait entraîné une diminution de la fréquence de battement des flagelles par rapport au cas d'un éclairage faible.

4.4 Identification des temps de corrélation en régime semi-dilué

On ne peut affirmer directement que les temps de corrélation mesurés dans le régime semi-dilué traduisent les mêmes phénomènes que dans le régime dilué. La fréquence des rencontres avec les autres nageurs augmentant avec la fraction volumique, la dynamique angulaire est susceptible d'être modifiée. Comme nous venons de le faire dans le régime dilué, nous pouvons nous servir des trajectoires pour donner un sens aux temps caractéristiques que nous mesurons (figure 16).

Les ondulations dues au mouvement hélicoïdal que l'on observe sur les trajectoires en régime dilué disparaissent peu à peu lorsque l'on augmente le nombre de nageurs dans l'échantillon. Les changements de direction de grande amplitude (correspondant aux réorientations aléatoires dans le régime dilué) sont toujours présentes et deviennent de plus en plus fréquentes. Les trajectoires deviennent de plus en plus irrégulières. À certains points de la trajectoire, il arrive que l'algue reste quasiment immobile pendant quelques images (figures 16c-16d). Lorsque le temps moyen entre deux rencontres de nageurs devient de l'ordre du temps mis par une algue pour effectuer une rotation hélicoïdale, les temps de corrélation que l'on mesure se mettent à refléter de plus en plus le phénomène d'interaction entre les nageurs.

4.5 Évolution des temps et longueurs de corrélation avec la distance moyenne inter-nageurs

Dans le régime le plus dilué, les temps de corrélations angulaires sont constants, suggérant que les algues nagent indépendamment les unes des autres, avec une fré-

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

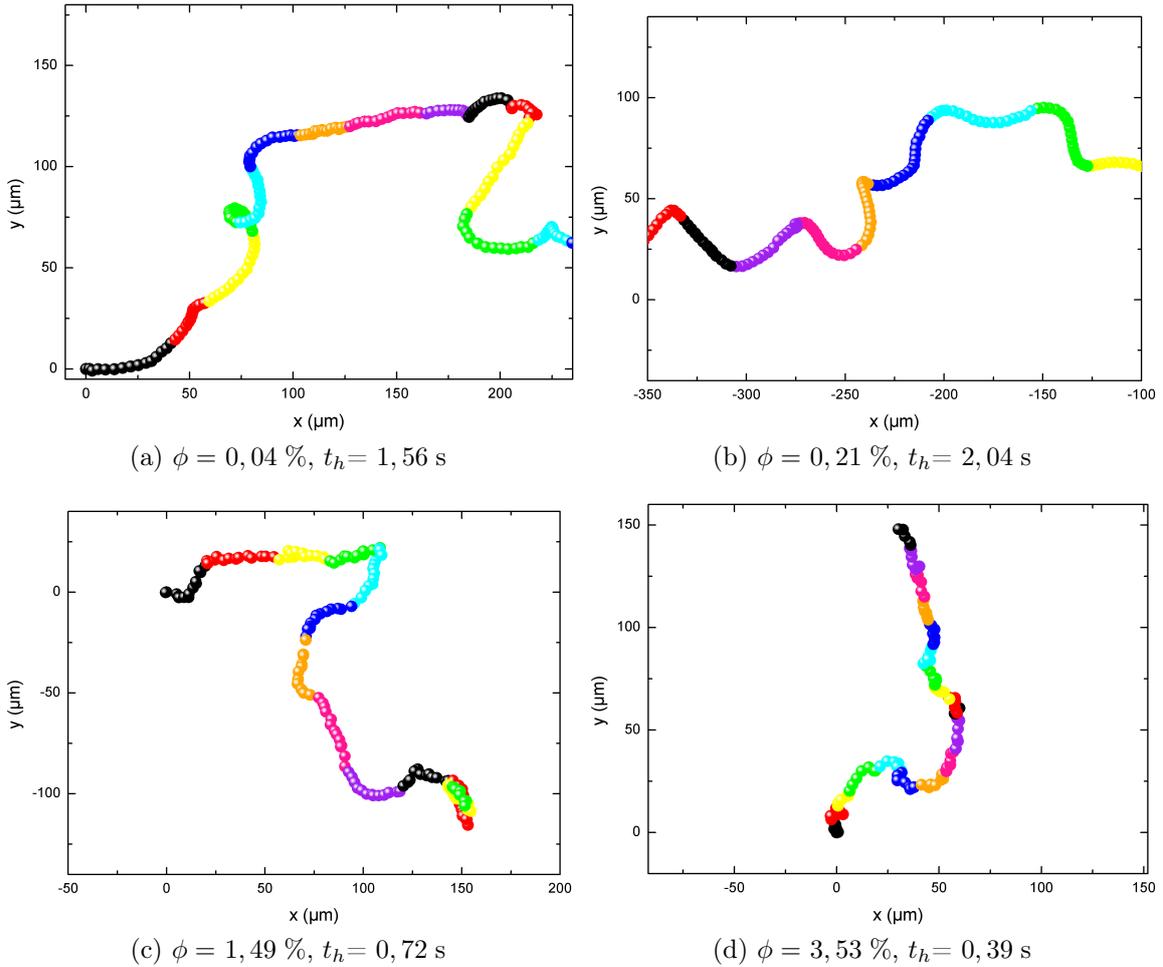


FIGURE 16. Trajectoires reconstruites à différentes fractions volumiques ϕ dont la couleur des points change à chaque intervalle de temps t_h . Toutes les trajectoires sont représentées à une même échelle pour faciliter la comparaison. Sur les figures 16c et 16d, on observe à certains points que l'algue ne se déplace presque plus pendant quelques instants avant de repartir.

4. DISCUSSION

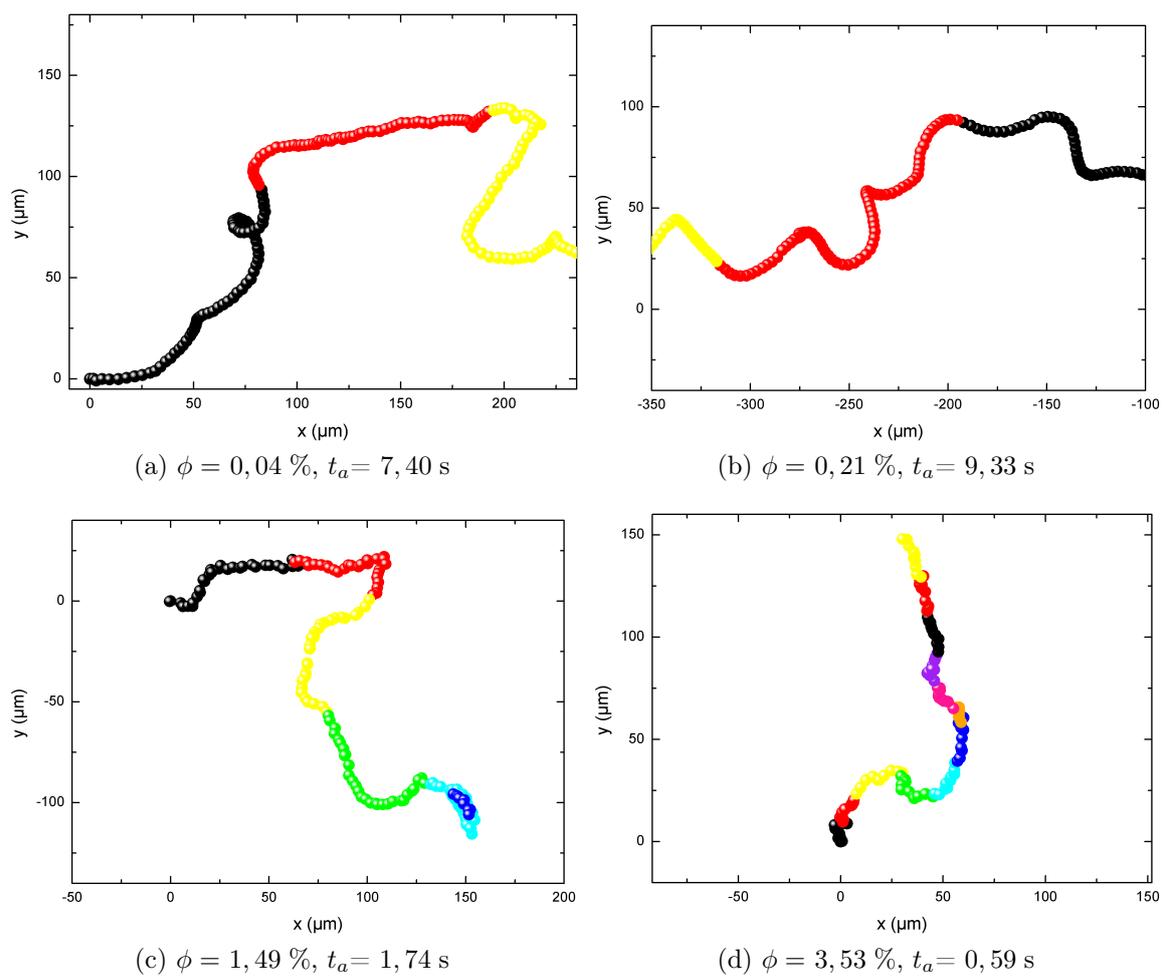


FIGURE 17. Trajectoires reconstruites à différentes fractions volumiques ϕ dont la couleur des points change à chaque intervalle de temps t_a . Toutes les trajectoires sont représentées à une même échelle pour faciliter la comparaison.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

quence de changement de direction régulée uniquement par des mécanismes internes à la cellule [52] et un mécanisme de rotation hélicoïdal déterminé par leur morphologie et leur manière de battre des flagelles.

Lorsque la distance moyenne entre nageurs devient de l'ordre du double du rayon hydrodynamique R_h que nous avons évoqué, les temps de corrélation se mettent alors à augmenter. Ce phénomène semble indiquer la présence d'un mécanisme d'interaction constructive entre les algues dans leurs déplacements. Les interactions hydrodynamiques entre les algues pourraient modifier la dynamique de nage individuelle. Ce type de phénomène n'est pas prévu par les modèles existants dans la littérature actuellement pour ce type de nageurs (« puller ») et n'a jamais été observé expérimentalement à notre connaissance.

Les temps de corrélation décroissent ensuite avec la distance moyenne entre nageurs d jusqu'à devenir très faibles tous les deux (figure 9). Cette décroissance est compréhensible puisque si les algues ne modifient pas leur vitesse de nage, plus il va y avoir de nageurs dans le milieu et plus elles vont se rencontrer souvent, donc devoir s'éviter ou se cogner les unes aux autres.

On observe également que le deuxième temps caractéristique correspondant au temps moyen de réorientation aléatoire en régime dilué, se rapproche de plus en plus du premier temps de corrélation à mesure que la fraction volumique augmente.

Pour établir l'importance des réorientations dues aux interactions avec les voisins par rapport aux réorientations aléatoires et aux rotations hélicoïdales, on peut établir un modèle simple de collisions balistiques sans interactions hydrodynamiques.

Calculons le libre parcours moyen l qu'aurait une algue si elle se déplaçait en ligne droite à sa vitesse balistique pendant un certain temps avant de rencontrer un obstacle. Au cours de son trajet, elle peut entrer en contact avec d'autres algues si celles-ci sont situées dans un disque en face d'elle (disque de contact) de diamètre égal à deux fois le diamètre D_C de la cellule. Le volume cylindrique ainsi couvert pendant la marche sera égal au produit de la distance que le nageur aura parcourue en ligne droite et de la surface du disque de contact. On peut calculer le libre parcours moyen entre deux chocs balistiques en écrivant que ce volume contient un nageur en moyenne. La distance moyenne entre particules étant d , ce volume est donc d^3 . Ainsi on peut écrire :

$$l = \frac{d^3}{\pi D_C^2} \quad (\text{IV.4})$$

Nous voyons que pour ce modèle simple sans interactions hydrodynamiques ni réorientations aléatoires, le libre parcours moyen varie comme le cube de la distance moyenne inter-nageurs. Si l'on trace cette fonction sur la même courbe que la longueur de persistance, on obtient une courbe qui se situe au dessus des longueurs de persistance que l'on a mesurées (figure 18). Considérons la nage dans le régime le plus concentré. Les réorientations dans ce régime sont principalement dues aux interactions « de contact » entre les algues car la distance moyenne les séparant est de l'ordre de deux fois leur diamètre. Les réorientations de contact sont plus fréquentes que les réorientations aléatoires dans cette situation si l'on estime que ces dernières sont principalement causées par un mécanisme biologique interne. Si l'on augmente

4. DISCUSSION

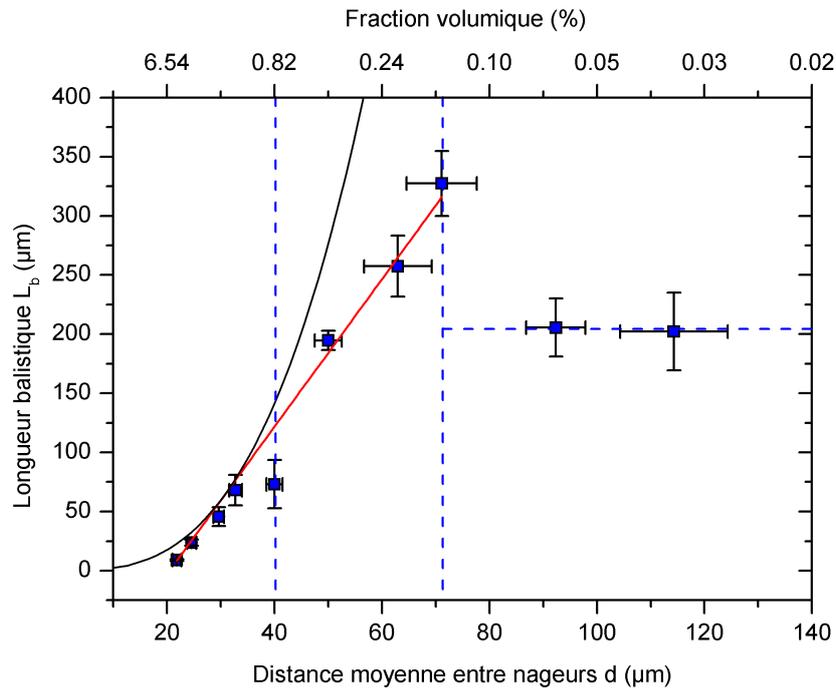


FIGURE 18. Longueur de persistance balistique et libre parcours moyen d'un modèle balistique type « sphères dures ». La courbe au dessus des données est le libre parcours moyen dans une suspension de sphères dures de diamètre de $12 \mu\text{m}$ se déplaçant balistiquement sans interaction à distance. Les points sont la longueur de persistance balistique en fonction de la distance moyenne entre les nageurs. Plus la distance entre nageurs augmente et plus les changements de direction deviennent fréquents par rapport à la situation où les algues nageraient en ligne droite et interagiraient par simple contact.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

la distance moyenne entre les nageurs, la proportion de réorientations aléatoires va augmenter par rapport aux rencontres entre nageurs. Ainsi, le libre parcours moyen (la longueur de persistance balistique) qui aurait dû augmenter comme d^3 si le seul mécanisme de changement de direction provenait des collisions, va augmenter moins vite du fait de ces réorientations aléatoires. À terme, ces réorientations aléatoires devraient prendre le pas sur les changements de direction dus aux rencontres entre nageurs et imposer la longueur de persistance balistique que l'on trouve dans le régime dilué.

En pratique, on observe que la longueur de persistance que l'on mesure devient plus grande que la longueur de persistance du régime dilué avant de diminuer lorsque la distance moyenne entre les algues devient plus grande que le rayon hydrodynamique R_h mesuré par Drescher et al. Ce phénomène suggère l'existence d'organisation collective dans cette zone de fraction volumique, probablement causée par des interactions de nature hydrodynamique cette fois (à plus longue portée que les interactions stériques).

En résumé, dans le régime le plus concentré, les changements de direction sont causés en majorité par les collisions entre les algues (interactions à courte portée). Ensuite ce sont les interactions hydrodynamiques couplées aux réorientations aléatoires qui affectent la dynamique générant une augmentation de la longueur de persistance par rapport au cas dilué. Puis dans le cas dilué, les interactions hydrodynamiques et les collisions entre micro-nageurs sont masquées par le phénomène de réorientation aléatoire naturelle des micro-algues.

4.6 Étude de la vitesse en régime semi-dilué

L'évolution des distributions de module de vitesse nous montre que la vitesse des algues est modifiée lorsque la fraction volumique augmente (figure 12). La forme de ces distributions change en fonction de la distance moyenne inter-nageurs d . Lorsque d devient de l'ordre de $60 \mu\text{m}$, la valeur $|\widehat{v}|$ du pic de la distribution s'est déplacée vers des valeurs de module de vitesse plus élevées que dans le régime dilué et la largeur de la distribution a augmenté. Lorsque d atteint une valeur de $40 \mu\text{m}$, $|\widehat{v}|$ se remet à décroître doucement avec la distance moyenne inter-nageurs.

L'apparition de modules de vitesse plus élevés lorsque la fraction volumique augmente suggère le développement de phénomènes collectifs comme nous l'avons évoqué au paragraphe précédent. L'élargissement de la distribution peut s'interpréter de la manière suivante. Si des phénomènes collectifs se développent, lorsqu'un nageur se trouve dans un écoulement généré collectivement, sa vitesse individuelle est augmentée (ou diminuée suivant l'orientation du nageur dans cet écoulement) par la vitesse du courant généré par le collectif des nageurs. Ainsi, des modules de vitesse plus élevés et plus faibles apparaissent dans la distribution.

Lorsque d atteint la valeur de $40 \mu\text{m}$, la fréquence des collisions entre nageurs qui augmente vient ajouter à la distribution des événements de faible module de vitesse. Plus d diminue et plus cette composante se développe. On voit apparaître un pic dans une zone de modules de vitesse bien plus faibles que pour le cas de la situation

5. RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES

diluée. Toutefois, même dans ces régimes concentrés, la queue de la distribution de module de vitesse reste assez longue, sous-tendant que les algues parviennent à nager à leur vitesse de nage normale entre deux chocs. On note que la queue de la distribution va moins loin que dans la zone où $|\widehat{v}|$ est maximal. Ainsi, les possibles phénomènes collectifs de cette zone de fraction volumique cessent d'exister dans la zone la plus concentrée.

5 Résumé et perspectives

Nous avons vu que la dynamique de nage des *Chlamydomonas Reinhardtii* était modifiée lorsque la distance moyenne entre les nageurs diminuait. Les temps de corrélation de direction et les longueurs de persistance caractérisent la manière dont nagent ces micro-organismes. Ces grandeurs sont constantes dans le régime dilué, indiquant que les algues nagent indépendamment et que leur dynamique individuelle est seulement régie par leurs caractéristiques biologiques et éventuellement par les stimuli extérieurs auxquelles elles sont soumises. La dynamique de nage est modifiée lorsque les cellules sont soumises à un éclaircissement auquel elles sont sensibles. Dans cette situation, la nage est plus dirigée. Ainsi les cellules peuvent s'échapper plus rapidement de la zone illuminée.

Les deux temps de corrélation et les deux longueurs de persistance augmentent brusquement lorsque la distance moyenne inter-nageurs d devient de l'ordre de sept diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, distance telle que les champs de vitesse des cellules commencent juste à s'interpénétrer en moyenne. Cette valeur particulière de d pour la transition et l'augmentation brusque des paramètres de corrélation suggèrent l'existence de phénomènes collectifs constructifs générés par les interactions hydrodynamiques entre les nageurs. L'augmentation de la valeur du module de vitesse le plus probable à partir de cette valeur de d supporte cette analyse.

En réduisant encore la distance entre nageurs, les longueurs de persistance se mettent à décroître linéairement avec la distance moyenne inter-nageurs d jusqu'à tendre vers zéro. Ce type de comportement ne peut être expliqué par un modèle d'interaction par chocs élastiques entre sphères dures se déplaçant balistiquement, pour lequel la longueur de persistance décroît avec le cube de d .

À partir d'une distance d de l'ordre de quatre diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, la décroissance du module de vitesse le plus probable suggère que les interactions entre nageurs commencent à devenir dominées par les interactions stériques et que les possibles phénomènes collectifs cessent. Cette analyse est supportée par la proximité des valeurs des longueurs de persistance balistique mesurées dans la zone des distance moyenne inter-nageurs inférieures à quatre diamètres de cellule, avec celles du modèle des sphères dures que nous venons d'évoquer, en utilisant un diamètre de sphère dure similaire au diamètre d'une *Chlamydomonas Reinhardtii*.

Nous avons souligné dans cette étude la possibilité de l'existence de phénomènes collectifs dans une suspension de micronageurs de type « puller ». L'étude des corrélations de déplacement et d'orientation de paires de particules pourrait permettre

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

de détecter avec certitude la présence de mouvements collectifs dans une suspension de micro-nageurs *Chlamydomonas Reinhardtii*.

La microscopie optique 2D nous a permis d'observer la dynamique de nage projetée dans un plan, la visualisation en 3D s'avère difficile avec ce type de dispositif à cause de la diffraction des rayons lumineux par les nageurs en suspension. L'observation dans ces systèmes concentrés devient de plus en plus difficile à mesure que la fraction volumique augmente. On pourrait tenter de déterminer l'importance du mécanisme de nage hélicoïdal dans les interactions entre nageurs en étudiant les algues avec un dispositif de visualisation tridimensionnel de type microscopie holographique par exemple. On pourrait essayer d'utiliser ce dispositif dans le régime semi-dilué au moins, là où la visualisation n'est pas encore trop détériorée par la diffraction de la lumière par les nageurs en suspension.

Il serait intéressant de réaliser une étude similaire en utilisant un dispositif avec une illumination à laquelle les algues ne sont pas sensibles pour déterminer dans nos résultats la part de la réponse phototactique dans la dynamique que nous avons étudiée. Il serait bon de déterminer également si les potentiels phénomènes collectifs que nous avons évoqués ont un lien avec la nage des algues dans une situation phototactique. Kessler avait observé que lorsque les algues étaient soumises à un éclairage intense, elles semblaient nager en essayant de se cacher les unes derrière les autres [39]. En augmentant la fraction volumique, cette particularité peut jouer un rôle dans les comportements que nous observons.

Les observations que nous avons réalisées nous permettent d'avancer qu'il existe un régime de fraction volumique avec ce type de suspensions pour lequel des phénomènes complexes existent. Il serait intéressant d'étudier la dynamique de nage de ce type d'organisme dans un écoulement de cisaillement pour déterminer le mécanisme par lequel ces organismes développent des phénomènes de résistance au cisaillement, et s'il s'agit simplement d'un facteur lié à la forme du micro-nageur ou bien si les interactions hydrodynamiques entre nageurs peuvent expliquer ce phénomène.

Annexes

Tentative de marquage des algues à la Rhodamine

Nous avons utilisé un cube spécialement conçu pour ce colorant (cube 41007 / Cy3[™] / TRITC (Rhodamine) Chroma[®]). Le cube est conçu pour exciter à 535 nm (vert) et récupérer la lumière émise autour de 610 nm (orange-rouge).

Notre protocole a été le suivant.

- Renouvellement du milieu de la culture : remplacement du milieu de culture par du milieu frais (par centrifugation à 120 g comme décrit au chapitre II) et remise de 15 mL de TAP frais pour 0.2 ml de concentré obtenu
- Repos de la culture pendant une heure pour laisser les cellules se ressourcer.
- Marquage : Ajout de 75 μL de solution de Rhodamine de concentration 2.10^{-3} mol/L à la suspension de *Chlamydomonas Reinhardtii* et repos de la suspension dans le noir pendant 10 min.
- Rinçage : (3 fois) Centrifugation à 120 g pendant 5 min, évacuation du liquide surnageant et ajout de 15mL de TAP (pas d'ajout de TAP la troisième fois)
- Préparation des échantillons à différentes concentrations : Pendant le cycle des rinçages, préparation du jeu d'échantillons d'algues non-marquées à différentes concentrations dans des tubes de 2 mL
- Mise en suspension des algues marquées : Après dernière centrifugation, et évacuation du surnageant, ajout d'un volume fixe de 5 μL de concentré marqué dans un premier échantillon de volume 0.5 mL de concentration donnée
- Agitation douce pour homogénéiser le mélange marquées - non-marquées
- Préparation des échantillons : Mise en capillaire sans attendre
- Positionnement sur la platine du microscope et acquisition d'images avec la caméra SensiCam et avec l'obturateur rapide commandé par la caméra afin de diminuer l'exposition au photoblanchiment
- Paramètres caméra : temps d'exposition : 61 ms, temps d'envoi des données vers l'ordinateur (non contrôlable) environ 49 ms (l'obturateur est fermé pendant ce laps de temps pour éclairer moins de temps les fluorophores et les cellules).
- Observation : La fluorescence des cellules marquées est très bonne au début mais décroît au cours du temps, jusqu'à ce que les algues marquées ne soient plus visibles du tout au bout d'à peine cinq minutes sur le microscope. Cela est dû en partie au photoblanchiment (phénomène limité par l'utilisation d'un obturateur rapide), mais surtout au fait que le colorant diffuse à travers les membranes des cellules et se disperse dans la suspension. Nous avons validé cette hypothèse en préparant simultanément deux échantillons identiques avec des cellules marquées ajoutées à des non marquées, puis en mettant un sur le microscope en lumière fluorescente pendant 5 minutes pendant que l'autre attendait dans le noir. Au bout des 5 minutes, nous avons placé le deuxième échantillon sur le microscope et avons vérifié que son niveau de fluorescence était comparable à celui qui avait été éclairé en lumière fluorescente.

Le colorant ne restant pas très longtemps à l'intérieur des membranes, il ne peut pas

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

être utilisé. Il aurait pu être utilisable éventuellement s'il était resté au minimum 20 minutes à l'intérieur des cellules. Cela aurait laissé le temps aux nageurs dans l'échantillon d'atteindre un état stationnaire, prérequis nécessaire au commencement d'un enregistrement. Ici nous n'avons pas eu le temps d'attendre cet état, sinon le colorant aurait diffusé avant que ne commence l'acquisition.

Nous avons donc essayé un autre colorant du même genre que la fluorescéine mais celui-ci équipé de chaînes de polymères censées l'empêcher de ressortir des membranes des cellules.

Tentative de marquage des algues à la Fluorescéine isothiocyanate-dextran

Après la rhodamine qui pénètre et ressortait facilement des cellules, nous avons essayé un colorant nommé fluorescéine isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (Sigma-Aldrich®). Il est composé de molécules de colorant FITC greffées sur du dextran. Comme nous l'avons vu au chapitre III, le dextran est un polymère composé de dextrose. Il est biocompatible et l'on peut l'utiliser par exemple pour augmenter la viscosité d'une solution aqueuse. Nous avons utilisé au chapitre précédent une forme de ce polymère avec une masse molaire moléculaire comprise entre 15,000 et 25,000. Cela représente une taille de polymère relativement petite mais suffisamment grande pour ne pas induire d'effet de pression osmotique sur les cellules.

Utilisé dans sa forme courte (masse molaire moléculaire \simeq 3,000-5,000) il peut pénétrer les parois des cellules et conjugué à un colorant, il peut permettre au colorant de se fixer à l'intérieur de la cellule. Nous l'avons utilisé ici pour empêcher la molécule FITC de ressortir aussi facilement que la rhodamine de la paroi des *Chlamydomonas Reinhardtii*.

Nous avons choisi le dextran car il est sans danger pour les algues comme nous l'avons vu dans le chapitre III lors de la mesure de l'effet de la viscosité du liquide porteur sur la dynamique de nage individuelle. La partie dextran de ce colorant est constituée de chaînes de relativement petite taille (masse molaire moléculaire \simeq 5,000). Nous pensions que la molécule serait capable de traverser les membranes des *Chlamydomonas Reinhardtii*. Nous avons choisi des chaînes de dextran plus longues lors du chapitre III pour éviter justement qu'elles ne puissent pénétrer à l'intérieur des cellules.

Nous avons utilisé le même protocole que pour la rhodamine mais n'avons pas réussi à marquer les cellules avec ce colorant car il ne parvenait visiblement pas à franchir la membrane des cellules. Nous avons augmenté le temps d'exposition de la suspension au colorant pour le marquage jusqu'à une heure trente mais cela n'a rien donné. Nous avons également augmenté la concentration de la solution de marquage sur une large gamme de concentration mais ça n'a pas mieux fonctionné. Il semble que la molécule n'arrive pas à entrer dans la cellule.

Nous avons donc décidé de passer à une autre famille de colorants. Ces derniers parviennent à passer à travers une membrane et ils réagissent avec l'intérieur de la cellule. Ils ne peuvent ensuite plus ressortir.

5. RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES

Tentative de marquage des algues avec le colorant CelltrackerTM Red CMTPX (Invitrogen®)

Comme le FITC-dextran ne pénètre pas dans les cellules, nous avons essayé un autre colorant qui est libre de pénétrer dans la cellule, qui réagit ensuite avec son environnement interne et qui ne peut plus ressortir ensuite. Nous avons essayé le colorant CelltrackerTM Red CMTPX.

Ce colorant contient une fonction chlorométhyle qui réagit avec le fonction thiol d'un peptide appelé glutathione présent en grande quantité dans la quasi-totalité des cellules. Une fois qu'il a réagit avec ce peptide, il ne ressort plus de la cellule. Le fluorochrome contenu dans la molécule de CellTrackerTM a son maximum d'excitation à la longueur d'onde de 577 nm (couleur jaune) et son maximum d'émission se situe à une longueur d'onde de 602 nm (couleur rouge).

Le protocole d'utilisation de ce colorant est similaire à celui du FITC-dextran, excepté que ce colorant doit être utilisé dans un milieu neutre ne contenant ni fonction amine ni fonction thiol pour éviter que le colorant ne réagisse avec ces fonctions sous peine de ne plus pouvoir pénétrer à l'intérieur des cellules.

Pour les *Chlamydomonas Reinhardtii*, il a fallu trouver un milieu neutre car celui recommandé par le fabricant du colorant (solution tampon phosphate saline) tuait les algues. Le milieu de culture des algues contenant des groupes amines, il n'a pas pu remplacer cette solution.

Nous avons trouvé dans la littérature [69] la composition d'un milieu sans nutriment ni groupe amine qui ne tuait pas les algues.

Voici les étapes du protocole de marquage utilisé :

- Préparer la solution pour le marquage des cellules avec le colorant comme indiqué sur le protocole du fabricant. Nous avons testé une gamme de concentration de marquage de 0,5 μM à 5 μM comme le conseillait le fabricant, puisque nous souhaitions effectuer une expérience sur une durée relativement courte, à savoir moins d'une journée.
- Récupérer les cellules dans leur milieu de culture par centrifugation.
- Resuspendre les cellules dans le milieu de marquage pendant une durée de 15 à 45 minutes en conditions de culture. Nous avons testé des durées de marquage allant de 15 à 90 minutes, suivant la concentration en colorant utilisée. Nous avons essayé de laisser incuber les cellules avec lumière et sans lumière.
- Remplacer le milieu de marquage par du milieu de culture frais et laisser incuber les cellules pendant une trentaine de minutes environ.
- Centrifuger les cellules. Remplacer le milieu de culture par le milieu neutre utilisé pour la préparation du milieu de marquage.
- Centrifuger à nouveau les cellules et remplacer leur milieu par du milieu neutre.
- Centrifuger les cellules et remplacer leur milieu par du milieu de culture frais. Les cellules sont désormais marquées.

CHAPITRE IV. EFFETS COLLECTIFS EN SUSPENSION SEMI-DILUÉE

Concentration en colorant (μM)	Durée du marquage (min)	ϕ pendant le marquage (%)	Cellules marquées (%)	État des marquées	Signal de fluorescence observé
0.5	15-30-60-90	0.2-1	0	-	-
1	15-30-60-90	0.2-1	0	-	-
2	15-30-60-90	0.2-1-2-20	$\simeq 10$	mortes	faible
3	15-30-60-90	0.2-1-2-20	$\simeq 10$	mortes	moyen
4	15-30	0.2-1-2-20	$\simeq 15$	mortes	fort
5	15-30	0.2-1-2-20	$\simeq 15$	mortes	fort

TABLE IV.2. Jeu de paramètres testés pour le marquage des algues avec le colorant fluorescent CellTrackerTM Red CMTPX. Le signal de fluorescence a été observé avec un objectif de grossissement $\times 20$ et d'ouverture numérique 0,45, une caméra Sensi-cam QE (PCO) avec un temps d'exposition de 60 ms et avec une lampe X-Cite[®] 120 (Exfo) dont la puissance délivrée dans le domaine spectral d'excitation du colorant CellTrackerTM était de l'ordre de 10 mW à demi-puissance. La durée du temps de marquage a joué essentiellement sur l'intensité du signal de fluorescence, mais peu sur la fraction de cellules marquées.

Nous avons suivi le protocole indiqué par le fabricant et afin de trouver le meilleur marquage possible, nous avons réalisé divers tests pour déterminer les paramètres optimaux pour la réalisation du marquage. Nous avons fait des tests sur la durée d'exposition des cellules au colorant, sur la concentration en colorant pendant le marquage et même sur la concentration en algues lors du marquage. Le tableau IV.2 récapitule les essais réalisés et les paramètres utilisés pour cela.

En synthèse, lorsque la concentration en colorant dans le milieu de marquage est supérieure à 2,5 μM , on obtient des cellules marquées en fluorescence. Le marquage n'est pas très efficace puisque seule une faible partie de la population est marquée (environ une à deux sur dix). Le problème majeur est que les cellules marquées sont toutes immobiles. On aurait pu imaginer que les cellules aient pu perdre leurs flagelles au cours du marquage (comme cela peut arriver par exemple lors d'un choc acide) et qu'en quelques heures elles aient repoussé [25]. Après plusieurs heures, les cellules étaient toujours immobiles, il est donc probable que le colorant les aient tuées ou bien qu'elles étaient déjà mortes au moment du marquage.

En conclusion, ce colorant n'a pas été utilisable pour notre étude puisque la faible quantité de cellules marquées obtenue est morte.

Chapitre V

Conclusion & perspectives

1 En résumé

Durant cette thèse, nous avons étudié la dynamique de nage d'un micro-nageur de type « puller », la micro-algue *Chlamydomonas Reinhardtii*. Pour cela, nous avons mis en place un dispositif expérimental permettant le suivi des déplacements de micro-objets en deux dimensions. Cette technique de suivi de particules couplée à un dispositif d'imagerie optique n'étant pas spécifique aux objets que nous avons utilisés, elle est réutilisable pour tout type de micro-objet visible en microscopie optique. Nous avons tenté sans succès de marquer ces algues avec un colorant fluorescent afin de pouvoir étudier leur dynamique dans un régime de haute fraction volumique. Toutefois, en utilisant la fluorescence naturelle de ces objets, nous avons pu étudier leur comportement dans des gammes de fraction volumique très intéressantes du point de vue de l'hydrodynamique.

Nous avons étudié au chapitre III la dynamique particulière de ces micro-algues avec notre dispositif lorsque les interactions entre elles étaient faibles. Les paramètres caractéristiques de la nage ont été déterminés aux différentes échelles de temps du mouvement, grâce à l'utilisation de caméra rapide ou sensible et de plusieurs objectifs de grossissements, ainsi que d'outils statistiques basés sur les trajectoires des nageurs.

Les cellules évoluant dans un fluide à faible nombre de Reynolds, elles utilisent pour se déplacer une stratégie de nage non-réciproque de type « mouvement de brasse ». Elles avancent en tirant le fluide à l'avant de leur corps avec leurs deux flagelles qu'elles ramènent le long de leur corps dans un mouvement circulaire, puis elles reculent d'une fraction de ce qu'elles ont avancé lorsqu'elles déroulent leurs flagelles vers le haut de leur corps. Ce mouvement de nage en zigzags pratiqué à une fréquence de l'ordre de la trentaine de Hertz, leur permet de déplacer leur corps à une vitesse instantanée pendant un battement v_b de l'ordre de $130 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce mécanisme de déplacement conjugué à une légère asymétrie de forme entre les flagelles, produit un mouvement hélicoïdal le long d'un axe de déplacement moyen lorsqu'il est observé à l'échelle de la seconde, à une vitesse de translation v_a de l'ordre de $50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ et à une fréquence de rotation $1/t_h$ de l'ordre du Hertz. Après quelques

CHAPITRE V. CONCLUSION & PERSPECTIVES

rotations autour d'une direction de déplacement moyenne, ces cellules se réorientent aléatoirement au bout d'un temps moyen t_a à cause de la désynchronisation momentanée de leurs flagelles durant quelques battements, puis elles reprennent leur dynamique de nage hélicoïdale dans une nouvelle direction.

L'analyse du comportement de la cellule sous augmentation de la charge soumise aux flagelles, a permis d'obtenir des informations sur les mécanismes biologiques impliqués dans la nage. Ainsi, la force que la cellule déploie pour se déplacer reste constante pour une viscosité du fluide porteur allant presque jusqu'au triple de la viscosité du milieu de culture. La cellule n'adapte pas la force qu'elle applique à ses flagelles pour conserver une vitesse de déplacement constante. Du point de vue de l'efficacité énergétique de ce type de mouvement, elle ne varie pas dans la gamme de charge appliquée aux flagelles que nous avons étudiée. Ainsi, la forme des flagelles au cours d'un mouvement de brasse ne semble pas modifiée par la viscosité du milieu. En simplifiant à l'extrême le mécanisme de battement des flagelles, nous avons estimé la friction exercée par les flagelles de la micro-algue sur le fluide. Les dimensions des flagelles équivalents que nous avons obtenus pourront être utilisés pour la réalisation d'un modèle simple de flagelle battant, en vue de mesurer le champ de vitesse instantané généré autour du micro-organisme au cours de la nage.

En plus de l'indépendance de la force exercée par la cellule sur le fluide environnant pour se déplacer, par rapport à la charge appliquée aux flagelles, nous avons vu que le nombre de battements moyen pendant une rotation hélicoïdale ne varie pas non plus. L'asymétrie entre les deux flagelles au cours du battement responsable de ce type de mouvement ne dépend donc pas de la viscosité du milieu dans la gamme étudiée.

Une troisième constante du mécanisme de nage de ces algues est le nombre de mouvements de zigzag séparant deux réorientations aléatoires. L'indépendance de ce nombre par rapport à la viscosité semble indiquer que le mécanisme responsable des réorientations n'est pas basé sur une horloge de temps absolue mais plutôt sur un nombre de battements. Cette observation est en contradiction avec l'idée que le bruit thermique soit le principal facteur de ces événements. En revanche, il est possible que des processus de nature bio-chimique soient en jeu. Polin et al. [52] ont émis l'idée que la cellule pouvait contrôler elle-même la différence de fréquence de battement entre ses deux flagelles, pour passer d'un mouvement hélicoïdal à une phase de réorientation. La nature du système permettant ce contrôle n'ayant pas été élucidée, seul a été suggéré que ce système devait être différent de celui régissant le phototactisme. Dans le cas des réorientations aléatoires, Polin et al. ont mesuré que le flagelle situé du côté de l'oeil rudimentaire de l'algue pouvait avoir une fréquence de battement plus élevée que le flagelle situé de l'autre côté ou bien l'inverse. Ce n'est pas le cas dans le régime phototactique. Le flagelle le plus proche du stigma se comporte différemment de celui situé de l'autre côté en présence de stimulation lumineuse. Notre observation suggère que le système qui déclenche les réorientations aléatoires en l'absence de stimulation lumineuse externe, se base sur le nombre de battements moyens que fait la cellule pour se déclencher plutôt que sur une horloge interne. Il s'agit d'une première indication dans la quête de la détermination de ce

2. PERSPECTIVES

système de contrôle.

Après avoir caractérisé la dynamique individuelle de ces micro-nageurs, nous avons étudié au chapitre IV les interactions entre les cellules en augmentant la fraction volumique des suspensions étudiées par rapport au cas dilué vu au chapitre III.

Lorsque la suspension est suffisamment diluée, les temps de corrélation ainsi que les longueurs de persistance de la dynamique évoqués plus haut ne dépendent pas de la fraction volumique. Dans ce régime, ces temps et longueurs caractérisent la manière dont nagent ces micro-organismes. Leur indépendance à la distance moyenne entre nageurs d indique que la nage des algues est seulement régie par leurs caractéristiques biologiques et éventuellement par les stimuli extérieurs qu'elles recevraient.

De notre étude de la dépendance de ces paramètres de corrélation, nous avons pu tirer une distance moyenne entre nageur caractéristique. Une transition a lieu lorsque les grandeurs de corrélation augmentent brusquement en quittant le régime dilué. La distance moyenne inter-nageurs correspondant à cette transition est de l'ordre de sept diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, distance telle que les champs de vitesse des cellules commencent juste à entrer en contact en moyenne. Cette valeur particulière de d couplée à l'augmentation brusque des paramètres de corrélation suggère l'existence de phénomènes collectifs de nature constructive, générés par des interactions hydrodynamiques entre nageurs. L'augmentation de la valeur du module de vitesse le plus fréquent à partir de cette valeur de d supporte cette analyse.

Pour une fraction volumique supérieure à celle de la transition, les longueurs de persistance commencent à décroître linéairement avec la distance moyenne inter-nageurs d jusqu'à tendre vers zéro. Ce type de comportement nous permet d'affirmer que lorsque la fraction volumique augmente au delà de la transition, les interactions entre nageurs ne peuvent être expliquées par un simple modèle d'interaction par chocs élastiques entre sphères dures, pour lequel la longueur de persistance décroît avec le cube de d .

Lorsque la distance d devient de l'ordre de quatre diamètres de *Chlamydomonas Reinhardtii*, le module de vitesse le plus fréquent se met à décroître, et suggère que les interactions entre nageurs de nature stérique commencent à dominer la dynamique de l'ensemble, et que les possibles phénomènes collectifs cessent peu à peu. Les longueurs de persistance balistique mesurées dans la zone des distances moyennes inter-nageurs inférieures à quatre diamètres de cellule étant très proches de celles du modèle des sphères dures que nous avons utilisé conforte cette idée.

2 Perspectives

Pour aller plus loin dans l'étude de la dynamique de ces micro-nageurs, il reste plusieurs points à éclaircir. Si l'on considère le cas particulier des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii*, du point de vue de la dynamique individuelle de ces cellules, on peut se poser la question de la raison d'une dynamique de nage aussi complexe. Certaines hypothèses ont déjà été avancées, comme par exemple l'utilisation de réorientations aléatoires pour fuir plus facilement les prédateurs ou encore pour améliorer la recherche de sources de nourriture. Comme nous l'avons évoqué plus haut,

CHAPITRE V. CONCLUSION & PERSPECTIVES

le mécanisme de nage hélicoïdal pourrait servir à faciliter la détection de sources lumineuses en permettant à la cellule de balayer avec son oeil rudimentaire une plus grande zone de l'espace qui l'entoure que si elle ne tournait pas sur elle-même en avançant. La question du mécanisme de synchronisation des flagelles a été également beaucoup abordée dans la littérature et à ce jour l'hypothèse la plus plausible serait que la synchronisation se fasse par les interactions hydrodynamiques entre les deux flagelles battants [52]. Il a été soulevé dans la littérature que ce couplage pourrait s'accompagner d'un mécanisme de synchronisation d'origine bio-chimique. La manière dont les flagelles se désynchronisent reste également une question ouverte à ce jour. Une des pistes à privilégier se trouve du côté du mécanisme de battement des flagelles. Contrairement aux flagelles des cellules procaryotes qui sont bien connues aujourd'hui, la compréhension du fonctionnement des flagelles des cellules eucaryotes continue de progresser. La détermination des processus biochimiques en jeu dans la cellule au cours d'un battement devrait permettre de comprendre l'origine de la désynchronisation.

Dans le domaine de l'hydrodynamique, la mesure du champ de vitesse instantané généré par un type de micro-nageur a été réalisée récemment [22]. Des modèles numériques reproduisant ce champ de vitesse instantané pourraient permettre d'étudier plus en détail tous les aspects de la dynamique collective que nous avons évoqués au chapitre IV. Ils pourraient notamment permettre de vérifier si la présence de phénomènes collectifs chez les micro-nageurs de type « puller » est possible dans le cas où l'on tient compte de la nature fluctuante du champ de vitesse au cours du temps. L'influence du champ de vitesse instantané sur les interactions entre nageurs pourrait être mesurée expérimentalement à partir de notre dispositif en utilisant une caméra rapide comme celle utilisée pour l'étude des zigzags, ainsi qu'une lampe de forte puissance. Cette lampe serait nécessaire pour obtenir une quantité de lumière suffisante à la formation d'images en fluorescence avec un temps d'acquisition de la caméra très court. Une souche de *Chlamydomonas Reinhardtii* non-phototactique serait utile dans ce cas pour supporter les conditions lumineuses imposées par le fort éclairage. Ces conditions sont nécessaires pour étudier la dynamique en milieu concentré à des petites échelles de temps devant la durée d'un battement de flagelles.

Concernant la dynamique collective, la forme en hélice de la nage des micro-algues *Chlamydomonas Reinhardtii* pourrait servir à la synchronisation de cellules nageant dans une même direction, par exemple dans une situation de phototactisme dans une suspension de fraction volumique suffisamment élevée. Les flagelles des bactéries en forme de spirale se synchronisent en tournant grâce à l'interaction hydrodynamique, il est possible que cette forme de synchronisation existe également chez les *Chlamydomonas Reinhardtii*.

Nous avons observé en situation de phototactisme négatif qu'il semblait y avoir des phénomènes collectifs dans une gamme de fraction volumique où les interactions hydrodynamiques sont importantes dans la dynamique des micro-algues. Il serait intéressant d'effectuer des études complémentaires pour confirmer ou infirmer l'existence de ces phénomènes collectifs et également de vérifier si le phototactisme

2. PERSPECTIVES

négatif joue un rôle dans leur fonctionnement. Une étude similaire à celle que nous avons menée au chapitre IV pourrait être réalisée avec des mutants insensibles à la lumière pour voir si les effets que nous avons mis en évidence existent dans ces conditions. La comparaison de ces phénomènes collectifs avec ceux observés chez les micro-nageurs de type « pusher » pourrait permettre d'avancer dans la compréhension de la différence entre les propriétés rhéologiques de leurs suspensions. Forts des observations que nous avons réalisées en absence d'écoulement, il serait intéressant d'étudier l'effet d'un cisaillement imposé sur la dynamique des algues en conduisant une étude similaire à celle menée pendant cette thèse.

CHAPITRE V. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Bibliographie

- [1] A. Acrivos and E. Herbolzheimer. Enhanced sedimentation in settling tanks with inclined walls. *Journal of Fluid Mechanics*, 92(03) :435–457, 1979.
- [2] I. S. Aranson, A. Sokolov, J. O. Kessler, and R. E. Goldstein. Model for dynamical coherence in thin films of self-propelled microorganisms. *Physical Review E*, 75(4) :1–4, 2007.
- [3] A. Baskaran and M. C. Marchetti. Statistical mechanics and hydrodynamics of bacterial suspensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37) :15567–72, 2009.
- [4] B. Behkam and M. Sitti. Bacterial flagella-based propulsion and on/off motion control of microscale objects. *Applied Physics Letters*, 90 :023902, 2007.
- [5] D. E. Boakes, E. A. Codling, G. J. Thorn, and M. Steinke. Analysis and modelling of swimming behaviour in *Oxyrrhis marina*. *Journal of Plankton Research*, 33(4) :641–649, 2011.
- [6] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 7th edition, 1999.
- [7] R. M. Brown, D. A. Larson, and H. Bold. Airborne Algae : Their Abundance and Heterogeneity. *Science*, 143(3606) :583–5, 1964.
- [8] E. A. Codling, M. J. Plank, and S. Benhamou. Random walk models in biology. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 5(25) :813–834, 2008.
- [9] J. A. V. Costa and M. G. de Morais. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource technology*, 102(1) :2–9, 2010.
- [10] J. C. Crocker and D. G. Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1) :298–310, 1996.
- [11] J. C. Crocker and B. D. Hoffman. Multiple-particle tracking and two-point microrheology in cells. *Methods in cell biology*, 83(07) :141–78, 2007.
- [12] A. Czirók, I. M. Jánosi, and J. O. Kessler. Bioconvective dynamics : dependence on organism behaviour. *The Journal of experimental biology*, 203 :3345–54, 2000.
- [13] A. Decoene, S. Martin, and B. Maury. Microscopic Modelling of Active Bacterial Suspensions. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(5) :98–129, 2011.

- [14] C. Dombrowski, L. H. Cisneros, S. Chatkaew, R. E. Goldstein, and J. O. Kessler. Self-Concentration and Large-Scale Coherence in Bacterial Dynamics. *Physical Review Letters*, 93(9) :2–5, 2004.
- [15] K. Drescher, J. Dunkel, L. H. Cisneros, S. Ganguly, and R. E. Goldstein. Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011.
- [16] K. Drescher, R. E. Goldstein, N. Michel, M. Polin, and I. Tuval. Direct Measurement of the Flow Field around Swimming Microorganisms. *Physical Review Letters*, 105(16) :1–4, 2010.
- [17] O. Felfoul, E. Aboussouan, A. Chanu, and S. Martel. Real-time positioning and tracking technique for endovascular untethered microrobots propelled by MRI gradients. In *2009 IEEE International Conference on Robotics and Automation*, pages 2693–2698. IEEE, 2009.
- [18] K. W. Foster and R. D. Smyth. Light Antennas in phototactic algae. *Microbiological Reviews*, 44(4) :572–630, 1980.
- [19] M. Garcia, S. Berti, P. Peyla, and S. Rafai. Random walk of a swimmer in a low-Reynolds-number medium. *Physical Review E*, 83 :035301(R), 2011.
- [20] M. L. Ginger, N. Portman, and P. G. McKean. Swimming with protists : perception, motility and flagellum assembly. *Nature reviews. Microbiology*, 6(11) :838–50, 2008.
- [21] R. E. Goldstein, M. Polin, and I. Tuval. Noise and Synchronization in Pairs of Beating Eukaryotic Flagella. *Physical Review Letters*, 103(16) :168103, 2009.
- [22] J. S. Guasto, K. A. Johnson, and J. P. Gollub. Oscillatory Flows Induced by Microorganisms Swimming in Two Dimensions. *Physical Review Letters*, 105(16) :18–21, 2010.
- [23] E. Gurarie and O. Ovaskainen. Characteristic spatial and temporal scales unify models of animal movement. *The American naturalist*, 178(1) :113–23, 2011.
- [24] B. M. Haines, I. S. Aronson, L. Berlyand, and D. A. Karpeev. Effective viscosity of dilute bacterial suspensions : a two-dimensional model. *Physical biology*, 5(4) :046003, 2008.
- [25] E. H. Harris. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, 2 edition, 2009.
- [26] Y. Hatwalne, S. Ramaswamy, M. Rao, and R. A. Simha. Rheology of Active-Particle Suspensions. *Physical Review Letters*, 92(11) :1–4, 2004.
- [27] J. P. Hernandez-Ortiz, C. G. Stoltz, and M. D. Graham. Transport and collective dynamics in suspensions of confined self-propelled particles. *Phys.Rev. Lett.*, 95 :203501, 2005.
- [28] J. P. Hernandez-Ortiz, P. T. Underhill, and M. D. Graham. Dynamics of confined suspensions of swimming particles. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 21(20) :204107, 2009.
- [29] N. A. Hill and T. J. Pedley. Bioconvection. *Fluid Dynamics Research*, 37(1-2) :1–20, 2005.

BIBLIOGRAPHIE

- [30] C. Hohenegger and M. J. Shelley. Stability of active suspensions. *Physical Review E*, 81(4) :1–10, 2010.
- [31] J. Howse, R. Jones, A. Ryan, T. Gough, R. Vafabakhsh, and R. Golestanian. Self-Motile Colloidal Particles : From Directed Propulsion to Random Walk. *Physical Review Letters*, 99(4) :8–11, 2007.
- [32] S. H. Hutner. Organic Growth Essentials of the Aerobic Nonsulfur Photosynthetic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 52 :213–221, 1946.
- [33] T. Ishikawa and T. J. Pedley. The rheology of a semi-dilute suspension of swimming model micro-organisms. *Journal of Fluid Mechanics*, 588 :399–435, 2007.
- [34] G. B. Jeffery. The Motion of Ellipsoidal Particles Immersed in a Viscous Fluid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 102(715) :161–179, 1922.
- [35] K. Josef, J. Saranak, and K. W. Foster. Ciliary behavior of a negatively phototactic *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell motility and the cytoskeleton*, 61(2) :97–111, 2005.
- [36] K. Josef, J. Saranak, and K. W. Foster. Linear systems analysis of the ciliary steering behavior associated with negative-phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(12) :758–77, 2006.
- [37] K. Katija and J. O. Dabiri. A viscosity-enhanced mechanism for biogenic ocean mixing. *Nature*, 460(7255) :624–6, 2009.
- [38] J. O. Kessler. Hydrodynamic focussing of motile algal cells. *Nature*, 313(5999) :218–220, 1985.
- [39] J. O. Kessler. Individual and collective dynamics of swimming cells. *Journal of Fluid Mechanics*, 173 :191–205, 1986.
- [40] D. Kim, A. Liu, E. Diller, and M. Sitti. Chemotactic steering of bacteria propelled microbeads. *Biomedical microdevices*, 2012.
- [41] D. L. Koch and G. Subramanian. Collective Hydrodynamics of Swimming Microorganisms : Living Fluids. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 43(1) :637–659, 2011.
- [42] I. M. Krieger and T. J. Dougherty. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Transactions of the Society of Rheology*, III :137–152, 1959.
- [43] K. C. Leptos, J. S. Guasto, J. P. Gollub, A. I. Pesci, and R. E. Goldstein. Dynamics of Enhanced Tracer Diffusion in Suspensions of Swimming Eukaryotic Microorganisms. *Physical Review Letters*, 103(19) :1–4, 2009.
- [44] J. Lighthill. Flagellar Hydrodynamics. *SIAM Review*, 18(2) :161, 1976.
- [45] W. C. McCrone. Köhler illumination. *Microscope*, 28 :15–19, 1980.
- [46] B. J. Nelson, I. K. Kaliakatsos, and J. J. Abbott. Microrobots for minimally invasive medicine. *Annual review of biomedical engineering*, 12 :55–85, 2010.

- [47] J. Palacci, C. Cottin-Bizonne, C. Ybert, and L. Bocquet. Sedimentation and Effective Temperature of Active Colloidal Suspensions. *Physical Review Letters*, 105(8) :1–4, 2010.
- [48] C. S. Patlak. Random walk with persistence and external bias. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 15, 1953.
- [49] T. J. Pedley and J. O. Kessler. Bioconvection. *Science Progress*, 76(299, Part 1) :105–123, 1992.
- [50] T. J. Pedley and J. O. Kessler. Hydrodynamic Phenomena in Suspensions of Swimming Microorganisms. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 24 :313–358, 1992.
- [51] F. Peruani and L. Morelli. Self-Propelled Particles with Fluctuating Speed and Direction of Motion in Two Dimensions. *Physical Review Letters*, 99(1) :1–4, 2007.
- [52] M. Polin, I. Tuval, K. Drescher, J. P. Gollub, and R. E. Goldstein. Chlamydomonas swims with two "gears" in a eukaryotic version of run-and-tumble locomotion. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5939) :487–90, 2009.
- [53] E. M. Purcell. Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*, 45(1) :3–11, 1977.
- [54] S. Rafai, L. Jibuti, and P. Peyla. Effective Viscosity of Microswimmer Suspensions. *Physical Review Letters*, 104(9), 2010.
- [55] S. Ramaswamy. The Mechanics and Statistics of Active Matter. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 1(1) :323–345, 2010.
- [56] D. Ringo. Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in Chlamydomonas. *The Journal of Cell Biology*, 33(3) :543, 1967.
- [57] A. M. Roberts. Mechanisms of gravitaxis in Chlamydomonas. *The Biological bulletin*, 210(2) :78–80, 2006.
- [58] U. Ruffer and W. Nultsch. High-speed cinematographic analysis of the movement of Chlamydomonas. *Cell Motility*, 5(3) :251–263, 1985.
- [59] U. Ruffer and W. Nultsch. Comparison of the beating of cis- and trans-flagella of Chlamydomonas cells held on micropipettes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 7(1) :87–93, 1987.
- [60] U. Ruffer and W. Nultsch. Flagellar photoresponses of ptx1, a nonphototactic mutant of Chlamydomonas. *Cell motility and the cytoskeleton*, 37(2) :111–9, 1997.
- [61] J. Rupprecht. From systems biology to fuel—Chlamydomonas reinhardtii as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of biotechnology*, 142(1) :10–20, 2009.
- [62] D. Saintillan. The Dilute Rheology of Swimming Suspensions : A Simple Kinetic Model. *Experimental Mechanics*, 50(9) :1275–1281, 2009.
- [63] D. Saintillan. Extensional rheology of active suspensions. *Physical Review E*, 81(5) :1–10, 2010.

BIBLIOGRAPHIE

- [64] D. Saintillan. Kinetic models for biologically active suspensions. *Science*, pages 1–19, 2011.
- [65] D. Saintillan and M. J. Shelley. Orientational Order and Instabilities in Suspensions of Self-Locomoting Rods. *Physical Review Letters*, 99(5), 2007.
- [66] D. Saintillan and M. J. Shelley. Instabilities, pattern formation, and mixing in active suspensions. *Physics of Fluids*, 20(12) :123304, 2008.
- [67] N. Shao, C. F. Beck, S. D. Lemaire, and A. Krieger-Liszky. Photosynthetic electron flow affects H₂O₂ signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 228(6) :1055–66, 2008.
- [68] R. A. Simha and S. Ramaswamy. Hydrodynamic Fluctuations and Instabilities in Ordered Suspensions of Self-Propelled Particles. *Physical Review Letters*, 89(5) :1–4, 2002.
- [69] R. D. Sjoblad and P. H. Frederikse. Chemotactic responses of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and cellular biology*, 1(12) :1057–60, 1981.
- [70] A. Sokolov and I. S. Aranson. Reduction of Viscosity in Suspension of Swimming Bacteria. *Physical Review Letters*, 103(14), 2009.
- [71] R. Stocker and W. M. Durham. Tumbling for Stealth? *Science*, 325(July) :400–402, 2009.
- [72] G. Subramanian. Viscosity-enhanced bio-mixing of the oceans. *Current science*, 98(8) :1103–1108, 2010.
- [73] G. Subramanian and D. L. Koch. Critical bacterial concentration for the onset of collective swimming. *Journal of Fluid Mechanics*, 632 :359–400, 2009.
- [74] H. F. Svenstrup, J. Fedder, J. Abraham-Peskir, S. Birkelund, and G. Christiansen. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Human Reproduction*, 18(10) :2103–2109, 2003.
- [75] M. M. Tirado, C. Lopez Martiinez, and J. Garcia de la Torre. Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Application to short DNA fragments. *The Journal of Chemical Physics*, 81(4) :2047–2052, 1984.
- [76] J. Toner and Y. Tu. Long-Range Order in a Two-Dimensional Dynamical XY Model : How Birds Fly Together. *Physical Review Letters*, 75(23) :4326–4329, 1995.
- [77] J. Toner, Y. Tu, and S. Ramaswamy. Hydrodynamics and phases of flocks. *Annals of Physics*, 318(1) :170–244, 2005.
- [78] L. Turner, W. S. Ryu, and H. C. Berg. Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments. *Journal of Bacteriology*, 182(10) :2793–2801, 2000.
- [79] I. Tuval, L. H. Cisneros, C. Dombrowski, C. W. Wolgemuth, J. O. Kessler, and R. E. Goldstein. Bacterial swimming and oxygen transport near contact lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7) :2277–82, 2005.

BIBLIOGRAPHIE

- [80] P. T. Underhill, J. P. Hernandez-Ortiz, and M. D. Graham. Diffusion and Spatial Correlations in Suspensions of Swimming Particles. *Physical Review Letters*, 100(24) :1–4, 2008.
- [81] T. Vicsek, A. Czirók, E. Ben-Jacob, I. Cohen, and O. Shochet. Novel Type of Phase Transition in a System of Self-Driven Particles. *Physical Review Letters*, 75(6) :1226–1229, 1995.
- [82] J. C. Waters. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 185(7) :1135–48, 2009.
- [83] X.-L. Wu and A. Libchaber. Particle Diffusion in a Quasi-Two-Dimensional Bacterial Bath. *Physical Review Letters*, 84(13) :3017–3020, 2000.
- [84] S. Yim and M. Sitti. Shape-Programmable Soft Capsule Robots for Semi-Implantable Drug Delivery. *IEEE Transactions on Robotics*, pages 1–5, 2012.