

Galvanotaxie des paramécies

Matériel et méthodes

I. Culture des paramécies

Les paramécies utilisées sont des *Paramecium Caudatum* et les bactéries, dont elles se nourrissent, sont des bactéries KP.

A. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu fait à partir d'une infusion d'herbes de blé BHB (Bio herbe blé). La poudre d'herbe BHB est mise à infuser dans de l'eau bouillante pendant une heure environ. On y ajoute un tampon Tris-HCl (pH 6.7). Sous hotte à flux laminaire, on stérilise par filtration à l'aide d'un dispositif de type Büchner stérile possédant des pores de 2 μm . Cela permet d'éviter l'étape de l'autoclave qui n'est pas toujours évidente à planifier dans le cadre des PSE.

Nous obtenons alors des réserves de milieux stériles sous forme de flacons de 500 mL. Ces flacons sont parafilmés pour éviter toutes contaminations extérieurs et peuvent alors être stockés en dehors de la hotte à flux laminaire.

Aliquotage du milieu de culture :

Pour pouvoir utiliser plus facilement le milieu sans risque de contaminer un flacon entier, nous avons réalisé des aliquots de milieux dans des tubes Falcon stériles de 15 mL sous la hotte laminaire. Les tubes sont alors fermés hermétiquement avant d'être utilisés.

B. Culture au quotidien

Un tube contenant des bactéries ou des paramécies ne doit jamais être fermé hermétiquement, il faut juste poser le bouchon sur le tube sans le visser sans quoi les cellules seraient asphyxiées.

Pour les cultures hebdomadaires nous utilisons des tubes Falcon stérile de 15mL.

Pour les cultures destinées à être conservées plus longtemps, nous utilisons des tubes Falcon stériles de 50 mL. Ces tubes sont préparés en vue de longues périodes sans accès au laboratoire des PSE.

D'une semaine sur l'autre il faut :

- Réensemencer des tubes à moitié remplis avec des bactéries (KP). Pour cela il suffit de prélever entre 0.5 et 1 mL d'un tube déjàensemencé et de l'introduire dans un tube contenant environ 6 mL de milieu. Si l'on ne dispose pas déjà d'un tubeensemencé, il faut prélever des bactéries d'une culture sur boîte de pétri à l'aide d'un cure-dent stérile et sous la flamme d'un bec bunsen pour ne pas contaminer la boîte. Les bactéries sont ensuite introduites dans un tube contenant du milieu.
- Prélever 1 mL d'un tube contenant des paramécies et l'introduire dans un tubeensemencé en bactéries une semaine auparavant. Cela permet d'avoir d'une

semaine sur l'autre des paramécies suffisamment concentrées mais qui sont encore dans une phase de division exponentielle.

Environ une fois par mois il faut mettre du β -Sitostérol dans le tube de bactéries avant d'ajouter les paramécies (10 μ L pour 20 mL de milieu). Il est nécessaire à la bonne tenue des membranes des cellules.

Si une culture rapide est nécessaire, il est possible de mettre les bactéries en culture sous agitation à 37° C et les paramécies à 29° C. Faire attention cependant qu'elles ne restent pas trop longtemps pour que le milieu ne s'évapore pas complètement. Pour cela nous avons utilisé un agitateur thermostaté.

II. Observation des paramécies.

A. Le canal

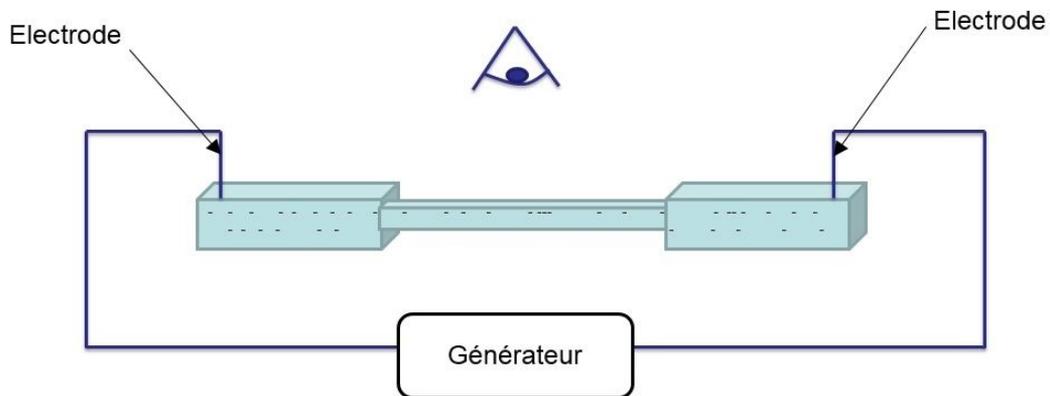


Schéma du montage expérimental

Pour pouvoir observer la galvanotaxie nous avons réalisé un canal en polydiméthylsiloxane (PDMS). Pour ce faire, il nous a fallu réaliser un moule en plexiglas que nous avons rempli de 90% en masse de PDMS et 10% de réticulant. Il faut ensuite éliminer les bulles d'air en tirant sous vide avant de mettre à l'étuve pendant 2h à 70° C.

Les dimensions du canal sont les suivantes : 3 mm de large, 80 mm de long et 4 mm de profondeur. Il faut également prévoir des piscines aux extrémités du canal pour recevoir les électrodes. Les piscines doivent avoir un volume suffisamment grand pour que les paramécies du canal ne soient pas impactées par une éventuelle dégradation des électrodes (électrolyse de l'eau). Nos piscines avaient pour dimensions : 30*30*10 mm. Le canal et les piscines sont par la suite remplis avec du milieu de culture.

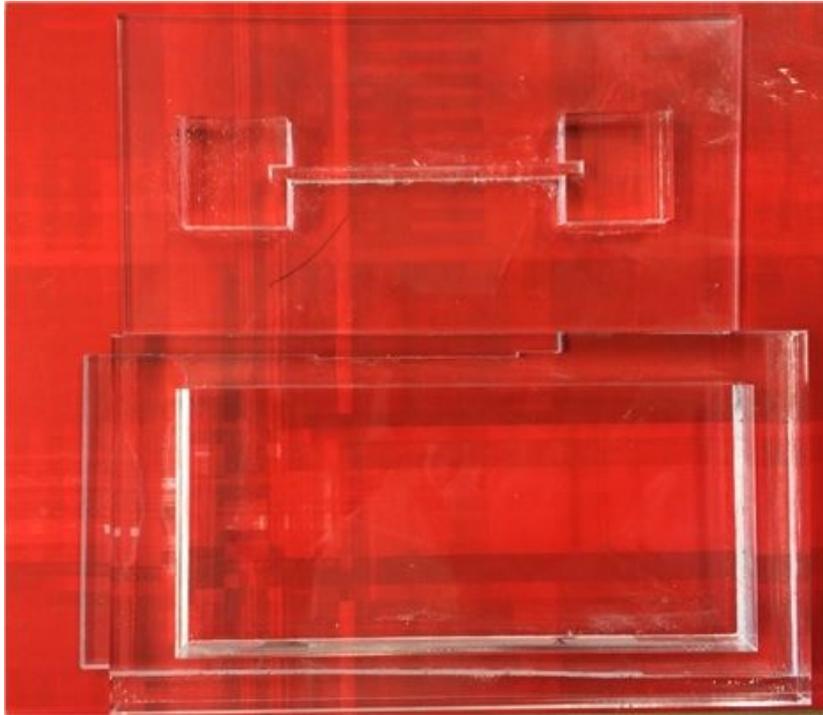


Photo du moule en plexiglas ayant servi à la réalisation du montage

B. La loupe binoculaire

Les observations des paramécies dans le canal et du phénomène de galvanotaxie sont faites à l'aide d'une loupe binoculaire Nikon à zoom continu.

C. La caméra

Une caméra CCD (2048*2048 px) Basler est montée sur la loupe. Cette caméra est connectée en USB 3.0 à un ordinateur équipé d'un disque dur SSD permettant l'acquisition de vidéos non compressées avec une fréquence d'acquisition pouvant aller jusqu'à 50 Hz. Le pilote de la caméra est Pylon View. Pour la plupart des vidéos nous avons utilisé un contraste automatique et une fréquence d'acquisition de 25 images par seconde.

D. Traitements des images et vidéos

Après acquisitions des images et des vidéos, ces dernières sont traitées à l'aide d'un plugin Matlab Cell Tracker (<http://www.celltracker.website/index.html>)

E. Observations des paramécies immobilisés

Lorsque nous avons immobilisés les paramécies (cf protocoles présentés dans la partie IV), nous avons utilisés un microscope au grossissement x40 pour observer les paramécies. 100 à 200 μ L de milieu contenant des paramécies sont placés dans un puits d'une lame à dépression. Après mise au point du microscope, nous vérifions que les paramécies immobiles sont bien vivantes et possèdent ou non des cils, suivant le protocole utilisé. Ces paramécies sont ensuite transférées dans le canal pour les expériences de galvanotaxie.

Nous avons pu acquérir des images à fort grossissement de ces paramécies immobilisés car le microscope dispose d'une caméra Basler identique à celle utilisée avec la loupe binoculaire pilotée par le logiciel Pylon View et relié à un ordinateur en USB 3.0.

III. Galvanotaxie

A. Électrodes

Les électrodes utilisées sont des électrodes en carbone, elles sont ainsi facilement modelables et inertes électrochimiquement. Il ne faut pas utiliser d'électrodes en cuivre qui, au passage d'un courant serait oxydé en Cu^{2+} nocif pour les paramécies. Les électrodes sont fixées au montage à l'aide de ruban adhésif.

B. Générateur

Pour être visible, le phénomène de galvanotaxie nécessite l'application de tensions comprises entre 30 et 150 V. Pour cela nous avons utilisé un générateur pour électrophorèse permettant d'atteindre sans difficulté ces tensions.

C. Génération d'un courant alternatif

Au cours du projet nous avons voulu voir l'influence d'un champ alternatif sur la galvanotaxie. Pour obtenir un tel champ nous avons utilisé le premier générateur comme source de courant et nous l'avons branché sur un relais. Le relais était commandé en tension par un GBF. Le GBF envoie un signal sinusoïdal d'amplitude 18V sur la voie de commande du relais. Il faut adapter l'amplitude en fonction du relais, de façon à obtenir un signal symétrique en sortie du relais.

Il suffit ensuite de brancher sur les voies de sortie du relais le générateur, mais en inversant les bornes sur une des deux sorties (+/- pour l'une et -/+ pour l'autre).

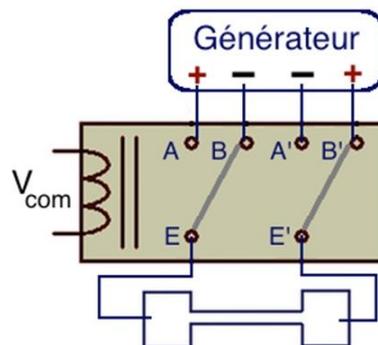


Schéma de principe d'un relais

IV. Mise en évidence des mécanismes impliqués dans la galvanotaxie

A. Immobilisation NiCl₂

L'introduction de chlorure de Nickel dans le milieu (0.1 mM), rend incohérent les battements ciliaires des paramécies. Les cils sont toujours présents sur la membrane.

On introduit 50 µL de NiCl₂ dans 1 mL de paramécies à 500 paramécies par mL. Avec une telle quantité de NiCl₂, les paramécies ne s'immobilisent pas immédiatement mais au bout de quelques minutes. Une plus grande quantité de chlorure de nickel accélère l'immobilisation mais risque de les tuer. Il faut adapter le protocole en fonction des résultats obtenus (ce sont des êtres vivants, pas de la chimie organique...).

Ce protocole a été adapté de l'article *Reversible immobilization of Paramecium caudatum by nickel ions*, Leszek KUZNICKI .

B. Déciliation à l'éthanol

Pour la déciliation des paramécies, nous avons utilisé le protocole suivant : solution d'éthanol à 10 % en volume et 0.1 % d'EDTA. Au bout d'une minute dans ce milieu on ajoute 20 µL de CaCl₂ (1 mM) puis on aspire les paramécies déciliées au fond dans le plus petit volume possible avant de les remettre dans du milieu.

De façon plus prosaïque :

Dans un tube de 15 mL on introduit 400 µL d'éthanol absolu, 40 µL d'EDTA à 1 % en volume et 3 mL de Volvic. On ajoute ensuite 560 µL de paramécies concentrées à 1.5 paramécies par µL de milieu. On ajoute une minute plus tard les 20 µL de CaCl₂ et on retire les paramécies au bout de 2'30''.

Ce protocole est très variable selon la concentration en paramécies et les conditions extérieures (température notamment). Ne pas hésiter à adapter le temps pendant lequel les paramécies sont dans l'éthanol.

C. Immobilisation avec chlorure de manganèse

On centrifuge les paramécies à 250g pendant 2 minutes, on les rince deux fois dans de l'eau minérale (Volvic) puis elles sont resuspendues dans une solution de MnCl₂ à 0.3 % en masse pendant 20 minutes. On centrifuge ensuite à 250g pendant 2 minutes et on récupère le culot.

Les ions Mn²⁺ remplacent les ions calcium. Les canaux sont bouchés.

Le protocole fonctionne mais le taux de mortalité observé est élevé. A cela s'ajoute le fait que le chlorure de manganèse a tendance à précipiter dans le milieu ce qui ne favorise pas l'observation par la suite. Faute de temps pour adapter correctement ce protocole, nous ne l'avons finalement pas utilisé pour étudier la galvanotaxie. Nous avons opté pour l'utilisation d'EGTA.

Ce protocole est tiré de l'article *Temperature dependent expression of ciliary GPI-proteins in Paramecium* Y. Capdeville & A. Benwakrim.

D. Complexation des ions calcium (EGTA)

Au cours de nos expériences, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle des ions calcium dans le phénomène de galvanotaxie.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons complexé les ions calcium du milieu et donc du canal et aussi des piscines. Pour cela nous avons utilisé de l'EGTA à 1 mM. Nous avons essayé avec 100 μ M d'EGTA et les paramécies continuaient d'être sensibles au champ électrique alors qu'à 1 mM tout le calcium semble avoir été complexé puisqu'elles ne sont plus sensibles au champ électrique et elles nagent normalement.

Remarque : Il est préférable et plus commode de partir d'une première solution diluée d'EGTA (200 mM par exemple) plutôt que de travailler avec de l'EGTA solide (trop faible quantité pour être pesée). Pour réaliser la solution mère il faut utiliser de l'eau déionisée pour ne pas ajouter de calcium lors de la dilution.