



HAL
open science

Comportement en milieu encombré de la paramécie, un micronageur mécanosensible

Nicolas Escoubet

► **To cite this version:**

Nicolas Escoubet. Comportement en milieu encombré de la paramécie, un micronageur mécanosensible. Biophysique [physics.bio-ph]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS102 . tel-04135045

HAL Id: tel-04135045

<https://theses.hal.science/tel-04135045>

Submitted on 20 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
de Sorbonne Université

Spécialité : Physique

École doctorale n°564: Physique en Île-de-France

réalisée

au Laboratoire Jean Perrin

sous la direction de Alexis PREVOST

présentée par

Nicolas ESCOUBET

Sujet de la thèse :

**Comportement en milieu encombré de la
paramécie, un micronageur mécanosensible**

soutenue le 9 mars 2023

devant le jury composé de :

M.	NOBLIN Xavier,	Rapporteur
M.	RIEU Jean-Paul,	Rapporteur
M ^{me}	RAFAI Salima,	Examinatrice
M ^{me}	DE MALEPRADE Hélène,	Examinatrice
M.	CLÉMENT Éric,	Examineur
M.	PREVOST Alexis,	Directeur de thèse
M.	BRETTE Romain,	Co-directeur de thèse
M ^{me}	PONTANI Léa-Laetitia,	Co-encadrante de thèse

Abstract

Paramecium is a unicellular eukaryotic ciliate microorganism, about 100 micrometers long, that lives naturally in puddles or ponds and moves by beating the thousands of cilia that cover its surface. Despite its relative simplicity, it can respond to different types of stimuli (chemical, temperature, etc.) thanks to a reorientation mechanism called the Avoiding Reaction (AR). This Avoiding Reaction is also triggered during a mechanical stimulation of its anterior part and results from internal bioelectrical and biochemical processes. In this thesis, we focus our attention on this mechanosensitive behavior. For this purpose, we imaged paramecia swimming freely in pseudo-2D environments with or without obstacles in order to characterize their mechanosensitive properties and to understand how mechanosensitivity affects their swimming behavior.

In this thesis, we first focused on the behavior of paramecia evolving in an environment without any obstacle. We characterized the local dynamics of an AR, consisting of a backward swimming followed by a reorientation, as well as the statistics of AR on a larger scale and finally how spatial exploration in the absence of any obstacle is affected by AR. In particular, we showed that these spontaneous AR lead to a random walk-like swimming pattern with exponentially distributed step lengths.

In a second part, we studied the swimming of paramecia in environments with cylindrical obstacles. We observed that upon collision with an obstacle, paramecia were either passively deflected or triggered an AR. This obstacle-triggered AR, a signature of mechanosensitivity, is either triggered instantaneously or delayed. We then quantified the probability of triggering such AR as a function of the swimming speed and the obstacle size. Finally, we highlighted memory effects related to the history of previous collisions.

In a third part, we used numerical simulations of Active Brownian Particles to study their long time and long distance behavior. We characterized the efficiency of their spatial exploration by diffusion when different parameters were changed, such as the type of AR triggered (no obstacle-triggered AR, no AR at all, any type of AR) or the probability of an obstacle-triggered AR. These simulations suggest that in a periodic network of obstacles, the experimentally measured probability of obstacle-triggered AR coincides with an optimum of diffusion.

Keywords : Paramecium · behavior · microfabrication · locomotion · Avoiding Reaction · microswimmer · mechanosensitivity

Résumé

La paramécie est un micro-organisme unicellulaire eucaryote cilié d'une centaine de micromètres de long qui vit à l'état naturel dans des flaques ou des étangs et qui se déplace en battant les milliers de cils qui recouvrent sa surface. Malgré sa relative simplicité, elle peut répondre à différents types de stimuli (chimiques, de température, etc.) grâce à un mécanisme de réorientation appelé la "réaction d'évitement" (AR). Cette réaction d'évitement se manifeste aussi lors d'une stimulation mécanique de sa partie antérieure et résulte de processus bioélectriques et biochimiques internes. C'est cette faculté de mécanosensibilité qui nous a intéressés dans cette thèse. Pour cela, nous avons imagé des paramécies nageant librement dans des environnements pseudo-2D avec ou sans obstacles dans le but de caractériser leurs propriétés mécanosensibles et de comprendre comment la mécanosensibilité affecte leur nage.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes d'abord intéressés au comportement de paramécies évoluant dans un milieu sans obstacle. Nous avons caractérisé la dynamique locale d'une AR, constituée d'une nage arrière suivie d'une réorientation, ainsi que les statistiques des AR à plus large échelle et enfin, comment l'exploration spatiale en l'absence d'obstacle est affectée par les AR. Nous avons notamment montré que ces AR spontanées conduisent à une nage de type marche aléatoire dont la longueur des pas est distribuée exponentiellement.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié la nage des paramécies dans des environnements à obstacles cylindriques. Nous avons observé que lors d'une collision avec un obstacle, les paramécies étaient soit déviées passivement, soit déclenchaient une AR. Cette AR induite par la collision, signature de la mécanosensibilité, est soit déclenchée instantanément, soit retardée. Nous avons ensuite quantifié la probabilité de déclencher de telles AR en fonction de la vitesse de nage et de la taille des obstacles. Enfin, nous avons mis en évidence des effets de mémoire liés à l'historique des collisions antérieures.

Dans une troisième partie, nous nous sommes appuyés sur des simulations numériques de particules browniennes actives pour étudier leur comportement à temps long et à longue distance. Nous avons caractérisé l'efficacité de leur exploration spatiale par diffusion lorsque différents paramètres étaient changés, comme le type d'AR déclenchée (sans AR au contact, sans aucune AR, avec toutes les AR) ou la probabilité de déclencher une AR au contact. Ces simulations suggèrent que dans un réseau périodique, la probabilité d'AR au contact mesurée expérimentalement coïncide avec un optimum de diffusion.

Mots-clés : Paramecium · comportement · microfabrication · locomotion · réaction d'évitement · micronageur · mécanosensibilité

Remerciements

Je tiens à remercier Alexis et Laetitia pour leur confiance et leur écoute, pour avoir su m'épauler avec optimisme et bonne humeur à travers mes nombreux doutes et pour m'avoir accordé une grande liberté. Je remercie également Romain pour sa disponibilité et pour les nombreuses discussions enrichissantes sur la paramécie.

Je remercie également tout le jury pour la qualité des discussions et leur recul critique sur mon travail de thèse.

Merci à Malika et Anissa pour leur assistance sans faille lors de démarches administratives ou de commandes souvent laborieuses.

Je remercie les doctorants et post-docs avec qui j'ai pu avoir des discussions honnêtes. Merci en particulier à ceux du bureau 414 pour tous les bons moments passés, pour l'atmosphère joyeuse et pour leur ouverture d'esprit. Je n'en citerai aucun pour n'oublier personne.

Enfin, je remercie tout le laboratoire Jean Perrin, pour son ambiance chaleureuse, où l'on se sent bien pour vivre et travailler.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Étudier la mécanosensibilité	2
1.1.1	Systèmes artificiels	2
1.1.2	Systèmes <i>in vitro</i>	3
1.1.3	Systèmes vivants	4
1.2	La paramécie	10
1.2.1	Morphologie	10
1.2.2	Taxismes	13
1.2.3	Électrophysiologie de la réaction d'évitement	14
1.3	Sujet de thèse	15
2	Comportement en nage libre	19
2.1	Matériels et méthodes	19
2.1.1	Méthodes de culture	19
2.1.1.1	Préparation du milieu de culture WGP	19
2.1.1.2	Préparation du milieu bactérisé	20
2.1.1.3	Repiquage des paramécies	20
2.1.2	Préparation d'un échantillon	21
2.1.2.1	Préparation du milieu dilué	21
2.1.3	Montage expérimental	21
2.1.3.1	Description de la chambre d'observation	21
2.1.3.2	Traitement au plasma	22
2.1.3.3	Injection des paramécies	22
2.1.3.4	Microscopie et acquisition des données	22
2.1.4	Traitement et analyse d'images	24
2.1.4.1	Compression des images	24
2.1.4.2	Suivi de trajectoires	25
2.1.4.3	Nettoyage des données	28

2.1.4.4	Exclusion des trajectoires circulaires	28
2.1.4.5	Correction des inversions arrière-avant	30
2.1.5	Effet du milieu de culture sur la croissance et la vitesse des paramécies	32
2.1.5.1	Croissance des bactéries	33
2.1.5.2	Croissance des paramécies	33
2.1.5.3	Vitesse de nage des paramécies	35
2.1.6	Étude des effets d'adaptation	35
2.2	Dynamique locale d'une réaction d'évitement	40
2.2.1	Détection des AR	40
2.2.2	Description comportementale d'une AR	41
2.2.3	Réorientations hors du plan	43
2.2.3.1	Idée générale	43
2.2.3.2	Largeur $l(x)$	45
2.2.3.3	Longueur projetée $L(\theta_{\perp})$	45
2.2.3.4	Angle θ_{\perp}	45
2.2.3.5	Détection des AR hors du plan	45
2.2.3.6	Conclusion	46
2.2.4	Statistiques des AR	46
2.3	Statistiques d'une trajectoire typique	48
2.4	Mouvement brownien	50
2.5	Modélisation électrophysiologique et cinématique	54
3	Comportement en milieu encombré	55
3.1	Matériels et méthodes	55
3.1.1	Conception des piscines à obstacles	55
3.1.2	Détection des piliers	59
3.1.3	Détection des interactions paramécies-piliers	60
3.1.3.1	Couronne d'interaction	60
3.1.3.2	Angle d'incidence	60
3.1.3.3	Discrétisation de l'ellipse	61
3.1.3.4	Sélection des évènements	62
3.1.4	Interactions de contact	62
3.1.4.1	Critère sur la distance : couronne de contact	63
3.1.4.2	Contrôle de r_p et r_c	63
3.1.4.3	Critère angulaire	65
3.1.4.4	Détection de l'instant de la collision	66
3.1.5	Statistiques	66

3.2	Interactions passives	66
3.2.1	Interactions hydrodynamiques	70
3.2.1.1	Effet sur la vitesse	70
3.2.1.2	Effet sur l'angle d'incidence	71
3.2.1.3	Conclusion	74
3.2.2	Interactions de contact	75
3.3	L'OTAR, signature de la mécanosensibilité	77
3.3.1	Existence des OTAR	77
3.3.2	Deux types d'AR au contact et dépendance angulaire	79
3.3.2.1	Introduction	79
3.3.2.2	Méthodes d'analyse	81
3.3.2.3	Une modélisation simple des OTAR	84
3.3.2.4	Discussion	87
3.4	Influence de la vitesse de nage sur les OTAR	89
3.5	Influence du rayon de courbure sur les OTAR	90
3.6	Corrélations temporelles	94
3.6.1	Habitude	95
3.6.2	Sensibilisation	99
3.6.3	Excitabilité	101
3.6.4	Conclusion	101
4	Conséquences de la mécanosensibilité sur l'exploration spatiale	103
4.1	Matériels et méthodes	104
4.1.1	Simulations numériques	104
4.1.1.1	Modélisation de la forme de la paramécie	105
4.1.1.2	Adimensionnement des équations	106
4.1.1.3	Forces externes et couples	106
4.1.1.4	Modélisation de la réaction d'évitement et de la mécano- sensibilité	108
4.1.1.5	Effets de piégeage	110
4.1.1.6	Choix des paramètres	110
4.1.1.7	Statistiques et coefficients de diffusion	111
4.1.2	Expériences comportementales	112
4.1.2.1	Expériences en champ large	112
4.1.2.2	Calcul des moyennes	113
4.1.2.3	Statistiques	114
4.2	Résultats	115

4.2.1	Collisions et AR dans des environnements à obstacles	115
4.2.2	Effets de couloir	118
4.2.3	Influence de l'environnement sur la mécanosensibilité	118
4.2.4	Efficacité de l'exploration spatiale	120
4.2.5	Variation de la mécanosensibilité	122
4.2.5.1	Modélisation de $f_{AR}(\Phi)$	122
4.2.5.2	Modélisation de la mécanosensibilité	122
4.2.5.3	Résultats	122
5	Conclusion et perspectives	125
5.1	Conclusion	125
5.2	Origine moléculaire de la mécanosensibilité	126
5.2.1	Matériels et méthodes	127
5.2.1.1	Principe de l'ARNi	127
5.2.1.2	Protocole expérimental d'ARNi	128
5.2.1.3	Expériences comportementales	129
5.2.2	Inhibition des canaux de type Piezo	129
5.2.3	Inhibition de la stomatine	131
5.3	Comportement 3D	134
5.3.1	Matériels et méthodes	134
5.3.1.1	Montage expérimental et acquisition des images	134
5.3.1.2	Reconstruction des trajectoires 3D	135
5.3.2	Résultats préliminaires	136
5.4	Electrophysiologie d'une paramécie stimulée mécaniquement	138
5.5	Suivi automatisé	140
	Postface	143
	A Protocole de préparation du milieu WGP	145
	B Protocole de "repiquage" des <i>Paramecium tetraurelia</i>	147
	C Temps de contact des SE pour les mutants Pawn	149
	D Simulations numériques : trajectoires typiques	151
	E Article : Interaction of the mechanosensitive microswimmer <i>Paramecium</i> with obstacles	153
	References	163

Chapitre 1

Introduction

Contents

1.1 Étudier la mécanosensibilité	2
1.2 La paramécie	10
1.3 Sujet de thèse	15

Un très grand nombre d'êtres vivants, allant de la cellule unique aux organismes complexes multi-cellulaires comme l'humain, ont la capacité de s'orienter dans l'espace en percevant mécaniquement leur environnement immédiat. Ces comportements sont permis par la *mécanosensibilité*, c'est-à-dire la réponse spécifique à une stimulation mécanique. La perception d'une force induite mécaniquement peut moduler les processus physiologiques à l'échelle moléculaire, cellulaire ou celle de l'organisme entier. Chez les vertébrés, il existe des cellules nerveuses spécialisées dans cette tâche, que l'on trouve dans tous les organes tactiles. Chez l'humain par exemple, sa très grande sensibilité tactile est due à une haute densité de terminaisons nerveuses mécanosensibles sous la peau directement reliées au système nerveux central [1]. Ces terminaisons nerveuses sont appelées *mécanorécepteurs* et convertissent les déformations et les vibrations de la peau induites par des contacts mécaniques de différentes vitesses et indentations. Les membranes des mécanorécepteurs sont tapissés de pores mécanosensibles et leur ouverture induit le plus souvent un influx d'ions calcium depuis l'extérieur vers l'intérieur, ce qui conduit à une dépolarisation de la membrane et éventuellement à un potentiel d'action. Les organismes unicellulaires eux-mêmes sont en quelque sorte des mécanorécepteurs puisque leur membrane est aussi décorée de pores mécanosensibles. L'un des premiers canaux, découvert dans les années 90 chez la bactérie *Escherichia coli* est le canal non-spécifique MscL. Il a été montré que seule la tension latérale de la membrane suffit à ouvrir le canal (modèle *force-from-lipid*) plutôt que le cytosquelette interne ou un attachement externe [2, 3] (Fig. 1.1A). Le pore mécanosensible MscL est une protéine d'environ 80 kDa de masse moléculaire qui s'ouvre lorsqu'une tension membranaire de 1 à 25 mN/m est appliquée, résultant en un pore de

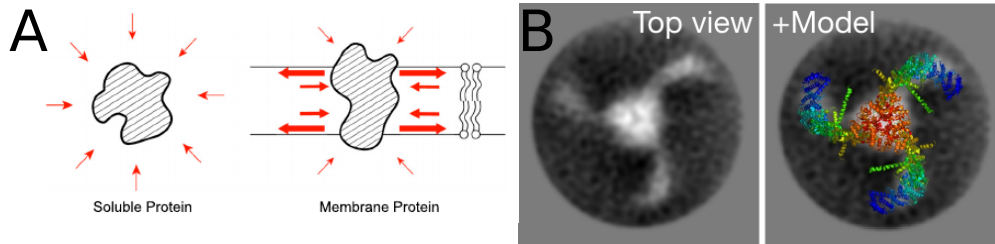


FIG. 1.1 (A) Schéma comparant une protéine dans le cytoplasme compressée quasi-isotropiquement à un ensemble de forces externes (*gauche*) et une autre insérée dans une bicouche lipidique soumise à des tensions latérales et à des forces de compression (*droite*). Figure adaptée de [3]. (B) Images en cryomicroscopie électronique d'une protéine Piezo1 reconstituée dans des vésicules (vue de dessus), et une comparaison avec un modèle structurel. Figure adaptée de [5].

2,8 nm de diamètre. Le travail requis pour étendre maximalement la protéine d'environ 20 nm^2 est de $50 k_B T$ [3]. Par contraste, le pore mécanosensible Piezo1, découvert en 2010 [4] et présent chez de nombreux vertébrés, est une protéine perméable aux ions calcium de masse moléculaire environ 1,2 MDa (Fig. 1.1B). Un travail d'environ $150 k_B T$ est requis pour que Piezo1 passe de sa configuration fermée à ouverte et l'expansion en aire correspondante est de 80 nm^2 [5].

À l'échelle de la bactérie, la principale force perçue est la pression osmotique. Ses principaux canaux mécanosensibles, MscL mais aussi MscS, servent donc de soupape de sécurité pour éjecter des solutés, baisser la pression hydrostatique et empêcher la rupture de la membrane lorsque de fortes pressions hydrauliques s'exercent sur sa membrane. Chez des organismes plus complexes comme l'humain, la mécanosensibilité peut avoir d'autres fonctions beaucoup plus évoluées comme la proprioception (perception de l'espace environnant), l'audition, ou le toucher.

1.1 Étudier la mécanosensibilité

1.1.1 Systèmes artificiels

Au sein du Laboratoire Jean Perrin (LJP), l'équipe MEBS (MÉcanique des Systèmes Biologiques intégrés et artificiels) dans laquelle s'inscrit ce travail de thèse, s'intéresse aux processus de transduction mécanique de l'échelle macroscopique jusqu'aux échelles moléculaires et cellulaires, en combinant approches biomimétiques et systèmes biologiques simples. Par exemple, quel type de contraintes subit un mécanorécepteur noyé dans une matrice complexe, telle que la surface de la peau des doigts? Scheibert *et al.* ont étudié

les propriétés de filtrage de la peau, en caractérisant comment les informations de texture de la surface d'un objet sont converties en vibrations sous-cutanées au voisinage des mécanorécepteurs, durant une exploration dynamique [6]. Pour cela, ils ont conçu un doigt biomimétique constitué d'un capteur et d'une membrane avec ou sans empreintes digitales (Fig. 1.2). Sans empreintes, le doigt agit comme un filtre passe-bas qui atténue toutes les modulations de pression induites par les composantes de la texture d'une longueur d'onde plus petite qu'environ 1 mm. Avec des empreintes périodiques de période λ , le système est assimilable à un filtre passe-bande autour de la fréquence spatiale $1/\lambda$. La présence d'empreintes amplifie d'un facteur 100 les modulations de contraintes induites par une texture de longueur d'onde caractéristique λ .

Cet exemple permet d'illustrer l'intérêt d'utiliser des systèmes artificiels pour la compréhension de systèmes biologiques complexes. Dans ce cas présent, cette approche biomimétique a permis de mieux comprendre le transfert d'un stimulus macroscopique à un mécanorécepteur microscopique.

1.1.2 Systèmes *in vitro*

À l'échelle d'un mécanorécepteur, comment l'information mécanique est-elle transformée en signal électrique? Les expériences *in vitro* notamment menées par l'équipe d'Ardem Patapoutian [4], Prix Nobel de Médecine 2021, ont permis d'identifier chez un mammifère le canal protéique Piezo, responsable de la mécanosensibilité et de caractériser sa réponse. Pour cela, ils ont stimulé mécaniquement par aspiration de pipette ou par indentation (Fig. 1.3A) des cellules souches nerveuses de souris (Neuro2A) et mesuré la réponse en courant par la méthode patch-clamp, à l'aide d'électrodes insérées dans la cellule (Fig. 1.3B). En inhibant le gène *Piezo1* par interférence ARN, ils ont déterminé que le courant émis après stimulation mécanique était minimal comparé à l'extinction de 72 autres gènes candidats mécanosensibles (Fig. 1.3C), faisant de la protéine transmembranaire *Piezo1* un composant essentiel de la mécanosensibilité chez Neuro2A. Elle est également exprimée chez de nombreux eukaryotes, dont *Paramecium tetraurelia* qui possède 6 membres de la famille Piezo. Ils ont montré que *Piezo1* était perméable aux ions Na^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} avec une meilleure affinité pour le calcium.

Sous stimulation mécanique prolongée, les courants médiés par *Piezo1* déclinent rapidement, en quelques millisecondes, selon deux mécanismes distincts : inactivation et adaptation. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment une force mécanique est couplée à l'ouverture des canaux ioniques [8]. Comme décrit plus haut, le principe *force-from-lipid* stipule que la force induite sur la membrane est transmise au canal par tension latérale sur la bicouche lipidique de la membrane [8, 7]. Des mécanismes

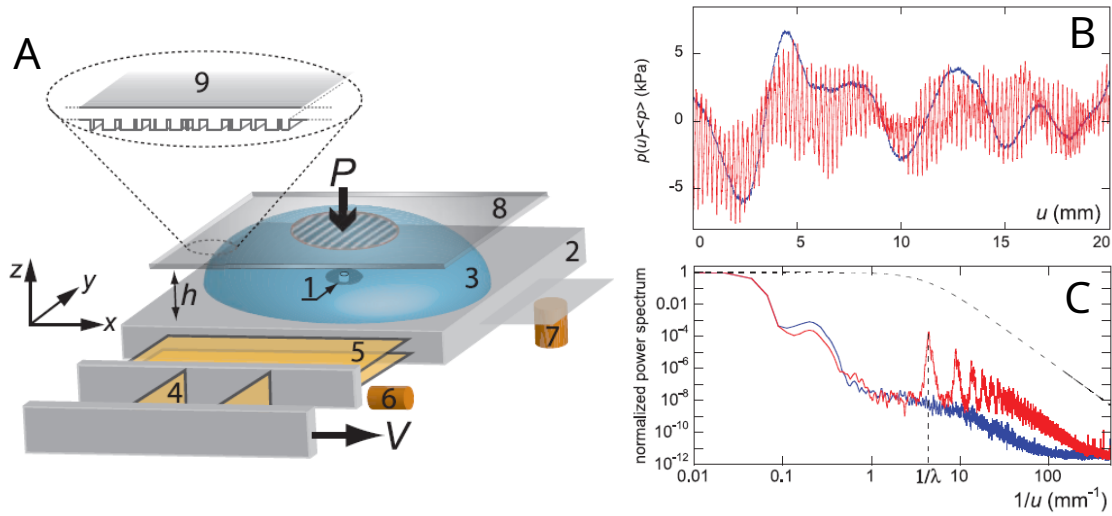


FIG. 1.2 (A) Schéma du dispositif expérimental. Un microsystème mécanique (MEMS) faisant office de capteur de force (1) est monté sur une base rigide (2) et couvert d'un dôme sphérique élastique mimant la peau du doigt. Celui-ci est constitué de PDMS et possède une épaisseur maximale de $h = 2$ mm. Sa surface est soit "lisse", soit "à empreintes", c'est-à-dire couverte d'une onde carrée de période $\lambda = 220 \mu\text{m}$ et de profondeur $28 \mu\text{m}$. Le capteur tactile est monté sur un système à double cantilever (4,5) permettant de mesurer la répartition de charge normale ou tangentielle exercées, grâce à des capteurs de position capacitifs (6,7). Au cours d'une expérience typique, le capteur MEMS est translaté à vitesse constante v et charge normale constante P , le long d'une lame de verre (8) dont la surface est texturée avec un motif de type code-barre aléatoire (9). (B) Variations de pression typiques $p - \langle p \rangle$ mesurées avec le doigt biomimétique lisse (bleu) ou à empreintes (rouge) en fonction du déplacement u . (C) Spectre de puissance normalisé de chaque signal obtenu par transformée de Fourier, moyenné sur 4 jeux de données, équivalents à un substrat de longueur totale 180 mm. La ligne pointillée est le spectre de puissance théorique pour la texture aléatoire utilisée comme stimulus mécanique. Toutes les figures proviennent de [6].

similaires permettent d'expliquer l'ouverture des canaux mécanosensibles MscL présents chez les bactéries [2, 3].

1.1.3 Systèmes vivants

L'approche pour laquelle nous avons opté repose sur l'étude de la mécanosensibilité à travers le comportement d'un organisme vivant. De nombreux auteurs en électrophysio-

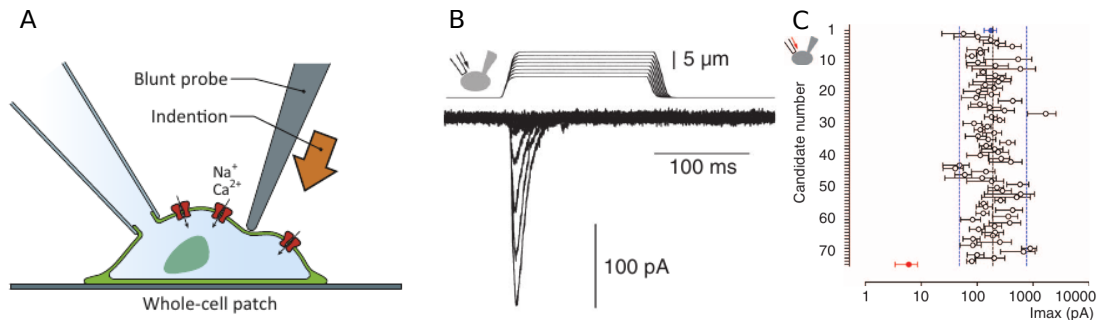


FIG. 1.3 Propriétés mécanosensibles des canaux ioniques Piezo. (A) Schéma d'une expérience d'indentation montrant une cellule déformée localement par un outil, typiquement l'extrémité polie d'une pipette en verre. Schéma issu de [7]. (B) Courants de mécanotransduction exprimés chez les cellules Neuro2A soumises à une série d'indentations mécaniques à pas constant, en voltage-clamp avec un potentiel électrique maintenu à -80 mV. (C) Amplitude maximale des courants de mécanotransduction chez les cellules Neuro2A transfectées avec des siARN contrôle (bleu, $n = 56$ cellules), des siARN Piezo1 (rouge, $n = 20$ cellules) ou des siARN sur d'autres candidats sélectionnés (blancs). Pour chaque candidat, le cercle noir et la barre d'erreur représente la moyenne \pm SEM, $n = 4$ à 27 cellules chacun. La ligne noire représente la valeur moyenne sur toutes les cellules testées ($n = 807$ cellules) et les lignes bleues pointillées représentent une augmentation ou une diminution de cette valeur d'un facteur 4. Ces deux figures sont reproduites de [4].

logie se sont saisis de la question, notamment durant la seconde moitié du XX^e siècle. H. S. Jennings, un zoologiste et généticien américain du XIX^e siècle a été un des premiers auteurs à s'intéresser au comportement mécanosensible des protistes [9], un sous groupe des eucaryotes unicellulaires qui comprend notamment les ciliés (comme *Paramecium* ou *Tetrahymena*) et les flagellés (comme *Chlamydomonas* ou *Volvox*). Ces micro-organismes évoluent à l'état naturel dans des étangs ou des flaques d'eau stagnante. Une des figures emblématiques des ciliés est *Paramecium*. Jennings a observé que pendant sa nage, lorsque la paramécie entre en collision avec un obstacle avec sa partie antérieure (étape 1, Fig. 1.4A), elle nage en arrière pendant un bref instant (étapes 2- 3, Fig. 1.4A), avant de se réorienter (étapes 4-5, Fig. 1.4A) et de reprendre à nouveau sa nage avant (étape 5-6, Fig. 1.4A). Cette réponse mécanosensible a été appelée *Réaction d'Évitement* (AR, *Avoiding Reaction*) [9]. La description globale¹ et généralement acceptée de la mécanosensibilité chez les protistes est la suivante. L'AR est provoquée sous stimulation mécanique anté-

1. La description détaillée de l'AR d'un point de vue électrophysiologique est faite en section 1.2.3.

rière par l'ouverture de canaux Ca^{2+} mécanosensibles, laissant entrer un courant Ca^{2+} qui augmente le potentiel membranaire (dépolérisation) et déclenche éventuellement un potentiel d'action, responsable de l'inversion de la direction de battement des cils, et donc de la nage arrière. Lorsque la paramécie est stimulée mécaniquement sur sa partie postérieure, une augmentation transitoire de sa vitesse de nage est observée, comme pour échapper à une condition défavorable ou à un prédateur. Cette réponse est nommée *Réaction d'Échappement* [10]. Elle est provoquée par l'ouverture de canaux K^+ mécanosensibles situés à l'arrière de la paramécie, créant un courant K^+ sortant qui diminue le potentiel membranaire (hyperpolarisation) et augmente la fréquence de battement des cils. L'allure typique du potentiel membranaire lors de la stimulation mécanique de la partie antérieure ou postérieure de la paramécie est montrée en Fig. 1.4B.

Ces deux types de réponse locomotrice transitoire à une stimulation mécanique ne sont pas seulement présentes chez *Paramecium*, mais sont aussi une signature de mécanosensibilité chez d'autres ciliés comme *Dileptus*, *Euplotes*, *Stylonychia* et *Tetrahymena* [9, 14, 15, 16]. On y retrouve à la fois la différenciation spatiale des réponses, qui permettent un échappement bidirectionnel à une stimulation mécanique, comme un obstacle ou un prédateur, ainsi que la signature ionique : flux entrant de Ca^{2+} à l'avant et flux sortant de K^+ à l'arrière. En plus d'une différenciation avant-arrière, tout un gradient de réponse à une stimulation mécanique le long de la surface membranaire a été observé chez *Paramecium* [13] et *Stylonychia* [12]. La réponse maximale à une stimulation mécanique se produit lorsque la cellule est stimulée sur le bout de sa partie antérieure (Fig. 1.4C, haut), puis cette réponse diminue jusqu'à s'annuler au centre longitudinal (Fig. 1.4C, milieu), et s'inverse jusqu'à atteindre un minimum sur le bout de sa partie postérieure (Fig. 1.4C, bas).

Lorsque la réponse des protistes à une stimulation mécanique n'est pas ciliaire, il s'agit souvent d'une contraction de la cellule, comme chez *Paramecium*, *Spirostomum*, *Stentor*, *Zoothamnium*, *Carcesium* ou *Vorticella* ou bien se caractérise par la formation d'un pseudopode, une excroissance qui sert à la capture d'une proie, comme chez Amœbae [16]. Toutefois, nous focaliserons notre étude sur les réponses mécanosensibles qui induisent un changement de la locomotion.

Dans toutes ces études des années 70, la paramécie est d'abord immobilisée puis stimulée mécaniquement avec un outil de quelques micromètres de diamètre, comme un stylet en verre ou une micro-aiguille. Une technique d'immobilisation classique en électrophysiologie s'appelle *the hanging droplet method* [17, 18]. Une cellule est prélevée avec aussi peu de liquide que possible et déposée par capillarité sous une lamelle couvre-objet. Plus tard, l'utilisation plus répandue des microscopes inversés, a permis de placer la goutte-

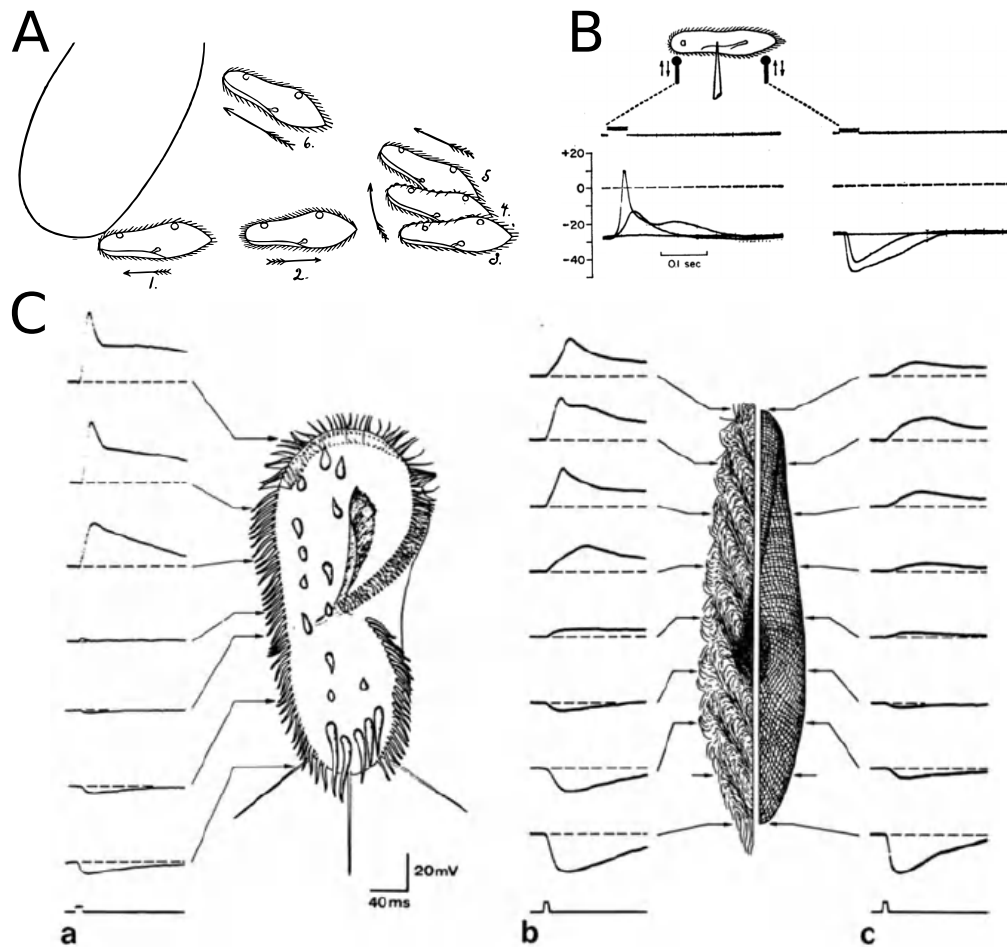


FIG. 1.4 (A) Schéma d'une paramécie effectuant une réaction d'évitement contre un obstacle, dont les positions successives sont marquées de 1 à 6 (adapté de [9]). La paramécie interrompt sa nage avant lorsqu'elle entre en collision avec l'obstacle (1); les cils se réorientent, provoquant une nage arrière (2); puis une réorientation angulaire de son corps entier (3-5); lorsque tous les cils ont retrouvé leur direction de battement initiale, la paramécie nage à nouveau en avant (6). (B) Réponse du potentiel membranaire (mV) à une stimulation mécanique avec un stylet en verre sur la partie antérieure (*gauche*) ou postérieure (*droite*) de la paramécie (adapté de [11]). Au dessus des courbes de potentiel est représentée la commande de tension de l'actionneur piézoélectrique pour le mouvement du stylet. (C) Distribution topologique de la réponse mécanosensible pour *Stylonychia* (a) (adapté de [12]) et *Paramecium* (b,c) (adapté de [13]). Chez une cellule déciliée (c), la propriétés mécanosensibles sont encore présentes. La partie antérieure des cellules est représentée vers le haut, et la face ventrale vers le lecteur.

lette directement sur le dessus de la lamelle [19]. Lorsque l'eau s'évapore, la taille de la goutte diminue et la cellule finit par être capturée par la tension de surface du film. Une pipette à crochet est approchée rapidement mais précisément dans la cellule, la fixant effectivement sur la lamelle. La cellule est ensuite rapidement recouverte par une solution expérimentale avant qu'elle ne s'assèche complètement. Après immobilisation, deux microélectrodes à haute résistance ($\simeq 50 \text{ M}\Omega$) sont implantées dans la cellule, l'une pour l'injection de courant, la seconde pour l'enregistrement de la tension intracellulaire. Une deuxième électrode de tension, l'électrode de référence, constituée d'un fil d'argent est maintenue à l'extérieur. Le potentiel membranaire est obtenu grâce à la différence de tension entre les deux électrodes de tension. Il s'agit d'une méthode de mesure de potentiels classique en électrophysiologie intracellulaire pour l'étude des canaux ioniques. Enfin, la stimulation mécanique est opérée en montant l'outil sur un micro-manipulateur piezoélectrique monitoré par ordinateur. La calibration du point de contact est effectuée à l'oeil et la stimulation est faite à indentation constante, en approchant l'outil dans la direction perpendiculaire à son axe long [12].

Malgré les nombreux apports des études en électrophysiologie à la compréhension de la mécanosensibilité chez les protistes, il existe peu de quantifications des propriétés mécaniques de la membrane, des déformations induites ou des forces appliquées ou de la taille de la perturbation. Sur la paramécie, Campillo *et al.* [20] ont quantifié la force créée par la nage de la paramécie $f_{swim} \simeq 50 \text{ nN}$ ainsi que la viscosité effective $\eta_{eff} = 0,14 \text{ N s m}^{-1}$ qui caractérise le frottement entre la membrane cellulaire avec le cortex. Les travaux de Jana *et al.* [21] fournissent une estimation du module élastique de la cellule, autour de $4,1 \pm 0,4 \text{ kPa}$ ainsi qu'une formule analytique pour la puissance liée à la nage de la paramécie. D'autres quantifications physiques permettraient de lier par exemple amplitude de la perturbation à la probabilité de déclenchement d'un potentiel d'action. Ce type d'approche a été entrepris par Jalaal *et al.* [22] sur la Dinoflagellée bioluminescente *Pyrocystis lunula*, une micro-algue qui ne nage pas, immobilisée par aspiration de pipette et stimulée mécaniquement par une seconde pipette (Fig. 1.5A) ou par un flux d'eau. Sous stimulation mécanique, des canaux calciques mécanosensibles s'ouvrent, la membrane de la vacuole se dépolarise, ce qui déclenche un potentiel d'action qui se transmet le long de la membrane de la vacuole jusqu'aux scintillons, de petites structures dans le cytoplasme. Le potentiel d'action active l'ouverture de canaux H^+ voltage-dépendant dans les scintillons, provoquant un influx d'ions H^+ à l'intérieur des scintillons et baissant leur pH. Cette réaction, qui provoque l'oxydation des protéines luciférines, catalysées par l'enzyme lucyférase, est à l'origine de l'émission de photons. Jalaal *et al.* ont montré un lien entre la production de lumière et l'amplitude et la fréquence de la déformation (Fig. 1.5B). En comparant

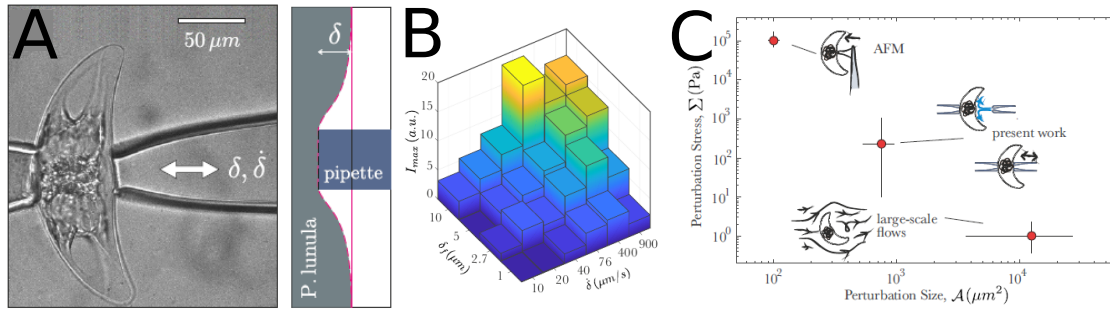


FIG. 1.5 *Bioluminescence mécaniquement induite à l'échelle de la cellule unique. Adapté de [22]. (A) Le dinoflagellé *Pyrocystis lunula* est immobilisée par aspiration de pipette et stimulée mécaniquement avec une seconde pipette avec une indentation δ et vitesse $\dot{\delta}$, ce qui produit un flash lumineux. (B) Histogramme de l'intensité lumineuse maximale en fonction de la déformation δ_f et de la vitesse de déformation $\dot{\delta}$. Dans le cas d'une déformation $\delta_f = 10 \mu\text{m}$, l'erreur standard est affichée. (C) Contrainte induite en fonction de la taille de la déformation pour plusieurs types d'expériences sur *P. lunula*, comme des mesures de forces au microscope à force atomique ou des mesures macroscopiques avec des approches hydrodynamiques.*

avec d'autres expériences sur le même micro-organisme mettant en jeu d'autres modes de stimulation mécanique, ils ont mis en évidence que plus la taille de la perturbation est petite, plus la force requise est grande (Fig. 1.5C). Cela suggère que la production d'une quantité donnée de lumière, à travers l'ouverture probabiliste de canaux ioniques mécanosensibles, peut être obtenue à travers l'action d'un grand nombre de canaux faiblement recrutés, ou d'un petit nombre de canaux fortement recrutés. D'autres études seraient nécessaires pour relier la taille de la déformation au nombre de mécanorécepteurs stimulés.

Toutefois, dans quelle mesure cette méthode de stimulation produit-elle des déformations de la membrane écologiquement réalistes ? À quel type de comportement pourrions-nous nous attendre dans leur environnement naturel ? D'autre part, l'immobilisation agit comme une force externe qui peut affecter les propriétés membranaires et la réponse du microorganisme. Enfin, l'implantation d'électrodes au sein de la cellule est une méthode intrusive. Il n'est pas clair comment leur présence affecte les propriétés mécaniques du microorganisme. Par exemple, la présence d'une pipette peut induire une précontrainte sur la surface de la cellule. En réalité, le mouillage seul de la membrane sur une pipette peut être suffisant pour déclencher l'ouverture des canaux mécanosensibles [23]. Pour ces raisons, et afin de se placer au plus proche des conditions naturelles, nous avons foca-

lisé notre étude sur le comportement mécanosensible d'un micro-organisme qui nagent librement dans des environnements à obstacles contrôlés.

Nous avons choisi d'étudier *Paramecium tetraurelia*, obtenue grâce à notre collaboration avec Eric Meyer de l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure à Paris, de par les facilités de culture et la robustesse de ce micro-organisme, sa grande taille qui permet d'implanter des microélectrodes pour des mesures d'électrophysiologie, la vaste littérature à son sujet particulièrement en génétique [24], et sa réaction mécanosensible (la Réaction d'Évitement) facile à identifier.

Nous nous sommes focalisés sur l'AR, celle-ci étant plus facile à déclencher dans un environnement avec obstacles. Il n'existe que très peu d'articles qui traitent des AR déclenchées mécaniquement, pour des paramécies en nage libre. Ishikawa et Hota [25] ont étudié les interactions paramécie-paramécie nageant librement dans un environnement pseudo-2D (Fig. 1.6A). Ils en ont déduit que la majorité des interactions paramécie-paramécie étaient de nature hydrodynamique et que les réponses mécanosensibles, la Réaction d'Échappement et l'AR (dont un exemple est montré en Fig. 1.6B), ne représentaient qu'une minorité des événements, sans que cela soit dû au confinement imposé par la chambre d'observation. Les AR se produisaient principalement lors de collisions avant-avant ou avant-milieu à cause de la localisation des canaux Ca^{2+} mécanosensibles (Fig. 1.6C). Ahmad *et al.* [26] ont développé un outil de microscopie robotique couplant suivi automatisé et stimulation mécanique contrôlée pour déclencher des AR sur des paramécies nageant librement (Fig. 1.6D). Leurs résultats suggèrent que la longueur de la nage arrière augmente avec la vitesse de stimulation (Fig. 1.6E).

1.2 La paramécie

1.2.1 Morphologie

La paramécie est un micro-organisme unicellulaire cilié qui vit à l'état naturel dans des eaux stagnantes, des flaques ou des étangs. Sa longueur est de 50-300 μm selon les espèces, mais dans le cas de *Paramecium tetraurelia* la longueur moyenne est de $117 \pm 9,62 \mu\text{m}$ et sa largeur moyenne est de $40,6 \pm 4,22 \mu\text{m}$ [27]. Sa forme est typiquement ellipsoïde avec une asymétrie avant-arrière et gauche-droite, de part la présence d'un sillon oral. Sa partie antérieure est plus fine que sa partie postérieure comme montré en Fig. 1.7A où la paramécie est orientée vers le haut.

Sa surface est uniformément couverte d'environ 4000 cils [31, 32] (Fig. 1.7B) servant à

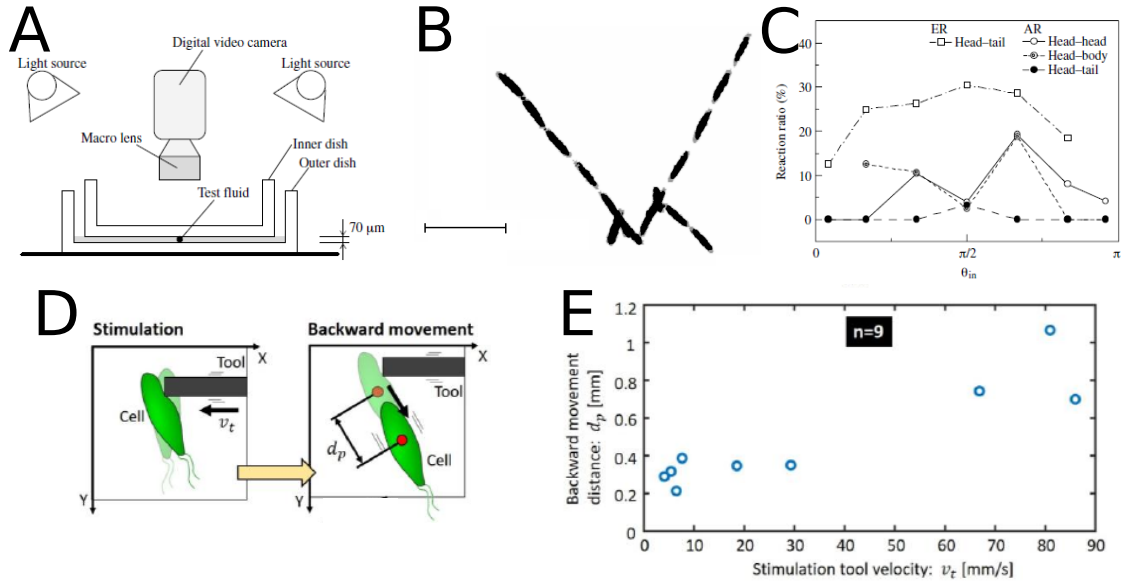


FIG. 1.6 (A) Dispositif expérimental pour l'observation des interactions paramécie-paramécie. La solution expérimentale est contrainte entre face externe d'une boîte de Pétri et la face interne de son couvercle. (B) Séquences d'images montrant deux *Paramecium caudatum* effectuant une AR après une collision. Les images sont espacées par $1/6$ s et la barre d'échelle est de $500 \mu\text{m}$. (C) Evolution du taux de réactions avec l'angle d'incidence θ_{in} pour la réaction d'évitement (AR) et la réaction d'échappement (ER). Les données sont classifiées selon les types de contacts. Par exemple, "head-tail", indique que la collision se produit entre l'avant de la paramécie 1 et l'arrière de la paramécie 2. Adapté de [25]. (D) Définition des paramètres pour la stimulation mécanique des paramécies et l'analyse des AR. (E) Corrélation entre longueur de nage arrière et vitesse de stimulation mécanique de l'outil. Les figures proviennent de [26].

la locomotion ou à la nutrition, et mesurant individuellement $10 \mu\text{m}$ de long pour $0,2 \mu\text{m}$ de diamètre [33]. Le coeur du cil est constitué de l'*axonème*, une structure tubulaire composée d'un arrangement de neuf doublets de microtubules (d'environ 25 nm de diamètre chacun), liés entre eux par de la *nexine*, entourant une paire centrale de microtubules. Chaque battement émerge de l'action collective de moteurs moléculaires (*dyneïne*) qui convertissent l'énergie chimique de centaines de milliers de molécules d'adénosine triphosphate (ATP) en un mouvement de glissement relatif entre les doublets de microtubules, créant ainsi une tension (d'environ 10 nN) qui permet le mouvement des cils par un mécanisme qui n'est pas encore pleinement compris [34]. Lors de la nage avant, les cils battent à une fréquence de $10\text{-}20 \text{ Hz}$ selon le cycle montré en Fig. 1.7C et dirigé vers l'arrière droit

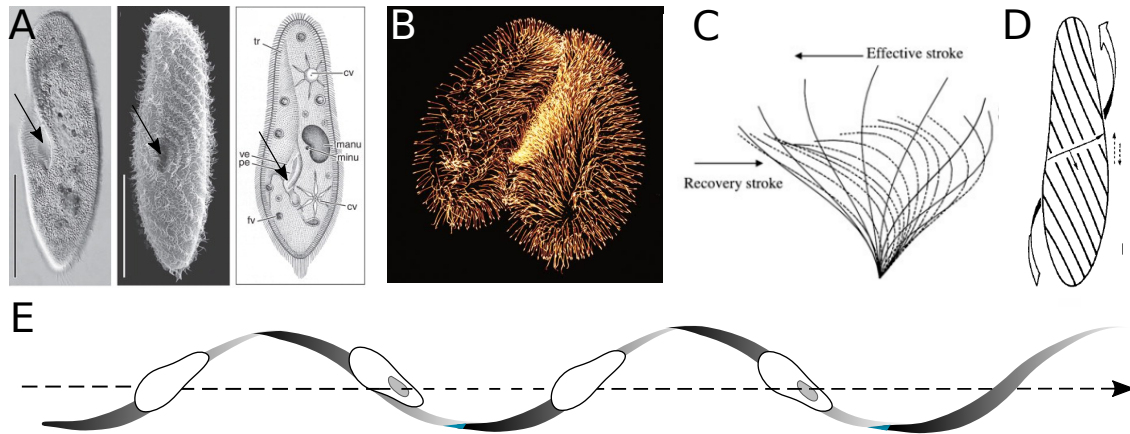


FIG. 1.7 (A) Image de *Paramecium caudatum* en microscopie (gauche) à lumière blanche et (milieu) électronique à balayage. (droite) Schéma d'une paramecie illustrant quelques caractéristiques morphologiques comme les vacuoles contractiles (cv), les vacuoles digestives (fv), le macronoyau (manu), le micronoyau (minu), le péristome (pe), les trichocystes (tr) et le vestibulum (ve). Une flèche noire indique le sillon oral. La barre d'échelle est de $100 \mu\text{m}$. Adapté de [28]. (B) Paire de *Paramecium tetraurelia* en conjugaison, imagées par microscopie à confocal. Les cellules sont transformées pour exprimer par fluorescence les protéines ciliaires. Image de A. Aubusson-Fleury, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette. (C) Cycle de battement d'un cil : effective stroke (ou power stroke) et recovery stroke. Adapté de [29]. (D) Ondes métachronales représentées par des lignes parallèles qui progressent de manière transversale, avec l'effective stroke des cils orienté vers la partie arrière-droit de la paramecie et la rotation autour de son axe longitudinal représenté par une large flèche blanche. Adapté de [30]. (E) Nage hélicoïdale avec le sillon oral faisant face à l'axe de l'hélice. Schéma de Héloïse Uhl.

de la paramécie [29]. Leur battement est coordonné sous la forme d'ondes métachronales (Fig. 1.7D) qui progressent à la vitesse d'environ $1 \mu\text{m}/\text{ms}$ à la surface de la paramécie [35]. Cela résulte en un mouvement hélicoïdal couplé à une rotation anti-horaire (quand elle est observée depuis sa partie postérieure) de la paramécie autour de son axe longitudinal, mais avec le sillon oral faisant toujours face à l'axe de l'hélice (Fig. 1.7E). Sa vitesse de nage est d'environ $700 \text{ mm}/\text{s}$.

La paramécie se nourrit de bactéries, d'algues ou de levures [36] qu'elle redirige grâce à ses cils vers le sillon oral où la nourriture est ensuite encapsulée dans des vacuoles digestives. Ce processus digestif permet expérimentalement de faire ingérer à la paramécie des marqueurs colloïdaux (billes fluorescentes, encre de Chine, etc.).

Le corps de la paramécie est enfermée par une structure élastique rigide et texturée, la *pellicule*. La surface extérieure est la *membrane cellulaire* ou *membrane plasmique* et en dessous, se situe une fine couche de plasma cellulaire appelé zone corticale ou *ectoplasme* qui contient notamment les cils ou les trichocystes, sortes de bâtonnets de quelques micromètres de long que la paramécie peut décharger rapidement pour se défendre [37]. Le *cytoplasme* contient les organelles, comme les vacuoles ou les noyaux. La paramécie possède deux noyaux, le macronoyau et le micronoyau qui contiennent son information génétique. Le macronoyau intervient dans la transcription génétique et dans les activités métaboliques de l'organisme, la croissance et la morphogénèse [36]. Le micronoyau permet principalement la reconstitution du macronoyau et l'échange de matériel génétique lors de la reproduction sexuée ; non seulement la paramécie peut survivre sans un micronoyau, mais elle peut également se reproduire (de manière asexuée uniquement). Ainsi, la paramécie possède deux types de reproduction : asexuée ou sexuée, selon les conditions environnementales. La plus courante, sous condition d'un environnement adéquat et d'une quantité suffisante de nourriture, est la reproduction asexuée par *division binaire*, toutes les 6h environ en conditions optimales. La paramécie peut également se reproduire de manière sexuée, par *conjugaison* avec une autre paramécie, ou par *autogamie* au sein d'un unique organisme, mais uniquement pour *Paramecium tetraurelia*. L'autogamie se produit après un certain nombre de divisions asexuées, environ 20, et lorsque la paramécie est soit en carence, soit trop nourrie [36].

1.2.2 Taxismes

Malgré sa relative simplicité, la paramécie est capable d'effectuer du *taxisme*, c'est-à-dire de produire une réponse comportementale à une grande variété de stimuli présents dans son environnement. Ainsi, elle est sensible aux contacts mécaniques grâce à ses propriétés mécanosensibles (*thigmotaxie*) [38], à la gravité (*gravitaxie*) [39, 40], à un flux

hydrodynamique (*rhéotaxie*) [9], à la température (*thermotaxie*) [41, 42, 43, 44], à un gradient chimique (*chemotaxie*) [45, 46], à un champ électrique (*galvanotaxie*) [47, 48], à la lumière (*phototaxie*) [49]. Cette complexité de comportements qui module sa locomotion est permise par une procédure essai-erreur dont l'ingrédient de base est la réaction d'évitement : lorsqu'une condition défavorable est rencontrée, une AR est déclenchée ce qui réoriente la paramécie dans une nouvelle direction, potentiellement plus favorable.

1.2.3 Électrophysiologie de la réaction d'évitement

L'activité bioélectrique et locomotrice de la paramécie est principalement contrôlée par l'ion Ca^{2+} (et plus indirectement par l'ion K^+). Typiquement, la concentration intracellulaire et extracellulaire de Ca^{2+} est de l'ordre de 10^{-7} M et 10^{-3} M, respectivement. Le flux auquel les ions Ca^{2+} se déplacent à l'intérieur de la cellule est appelé courant calcique. Une modélisation simple² (et linéaire) du courant calcique est donné par la formule ohmique :

$$I_{Ca} = g_{Ca}(V_m - E_{Ca}) \quad (1.1)$$

où I_{Ca} est le courant calcique proportionnel à la conductance de la membrane aux ions Ca^{2+} , g_{Ca} , et à la force électromotrice agissant sur Ca^{2+} , égale à la différence entre le potentiel membranaire, V_m , et le potentiel d'équilibre (ou potentiel de Nernst) de Ca^{2+} , E_{Ca} . En l'absence de stimulation, l'influx d'ions Ca^{2+} dû à la perméabilité calcique de la membrane est compensé activement par pompage d'ions Ca^{2+} vers l'extérieur, afin de garder un flux net de Ca^{2+} nul.

La Fig. 1.8A schématise le lien entre réponse comportementale et activité bioélectrique. Lorsque la partie antérieure de la paramécie est stimulée mécaniquement, la membrane cellulaire se déforme localement, ce qui exerce une tension sur les canaux Ca^{2+} mécanosensibles situés à la base des cils et provoque leur ouverture transitoire. L'ouverture de ces canaux calciques augmente localement la conductance de la membrane g_{Ca} et provoque un influx d'ions Ca^{2+} qui entraîne la dépolarisation de la membrane. Lorsque l'amplitude de la dépolarisation est suffisante, des canaux calciques voltage-dépendant situés dans les cils s'ouvrent, créant un courant calcique entrant et ainsi l'augmentation locale de la concentration en ions Ca^{2+} dans les cils³. Cette augmentation active à son tour un mécanisme Ca^{2+} -dépendant du moteur ciliaire qui produit une réorientation anti-horaire/horaire de la direction du *power stroke* des cils ainsi qu'une augmentation dans

2. Ce modèle peut s'avérer imprécis, notamment lorsque les concentrations intracellulaire et extracellulaire sont très différentes. A la place, le modèle de Goldman-Hodgkin-Katz linéaire est souvent utilisé.

3. Ce qu'on appelle potentiel d'action est l'évolution temporelle du potentiel pendant ce phénomène de rétroaction positive entre potentiel et entrée de calcium.

la fréquence de battement : la paramécie nage en arrière. Les canaux calciques mécanosensibles et voltage-dépendant s'inactivent rapidement (en quelques millisecondes) et le calcium est expulsé passivement ou activement. La concentration d'ions Ca^{2+} dans les cils diminue alors jusqu'à sa valeur d'équilibre ($[\text{Ca}^{2+}]_i \simeq 10^{-7}$ M), donnant lieu à la réorientation progressive des cils depuis une direction avant-gauche vers l'arrière-gauche de la cellule.

En l'absence de stimulation, une AR peut quand même avoir lieu. En effet, le potentiel membranaire au repos n'est pas constant mais présente des fluctuations aléatoires d'amplitude 1-3 mV [50, 51]. Si la fluctuation est d'amplitude suffisante, un potentiel d'action est généré et donne lieu à la cascade d'évènements décrits ci-dessus [52]. Le déclenchement du potentiel d'action ne résulte pas uniquement des fluctuations aléatoires de l'amplitude du potentiel membranaire, car celles-ci sont amplifiées par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant [52].

Cette description du lien entre activité bioélectrique et réponse ciliaire est simplifiée par souci de lisibilité. La Fig. 1.8B donne un aperçu de la complexité de l'AR et de son caractère fortement non linéaire. La compréhension plus fine des processus électrophysiologiques mis en jeu est bien décrite dans la littérature correspondante [54, 53, 55]. De plus, la section 2.5, issue d'un article publié en collaboration avec l'équipe de Romain Brette à l'Institut de la Vision [56], est consacrée à la modélisation du potentiel d'action et prend en compte les autres courants et canaux ioniques non présentés dans l'explication simplifiée ci-dessus. Les paramètres de la modélisation sont extraits d'expériences d'électrophysiologie sur des paramécies immobilisées et des mesures du battement des cils par vélocimétrie par images de particules (PIV). Puis le modèle est étendu à l'activité locomotrice grâce à des mesures comportementales de la paramécie en nage libre.

1.3 Sujet de thèse

Au cours de cette thèse, nous avons donc cherché à mieux comprendre et caractériser la mécanosensibilité de la paramécie et comment celle-ci peut influencer sa nage à temps longs. Comprendre la mécanosensibilité chez la paramécie ne peut se faire sans caractériser en amont sa nage en l'absence d'obstacle, ce que nous présentons dans le Chapitre 2 : quelle est la dynamique d'une AR spontanée, comment la paramécie nage-t-elle et explore-t-elle l'espace, à temps court et à temps long ? La caractérisation du comportement en nage libre a également été couplée à une modélisation électrophysiologique, incluant un modèle pour le potentiel d'action similaire à celui développé par Hodgkin et Huxley pour l'axone géant du calamar [57] et en relation avec le battement des cils [56]. Jusqu'à présent, aucune modélisation prenant en compte toute la chaîne intégrative et reliant la

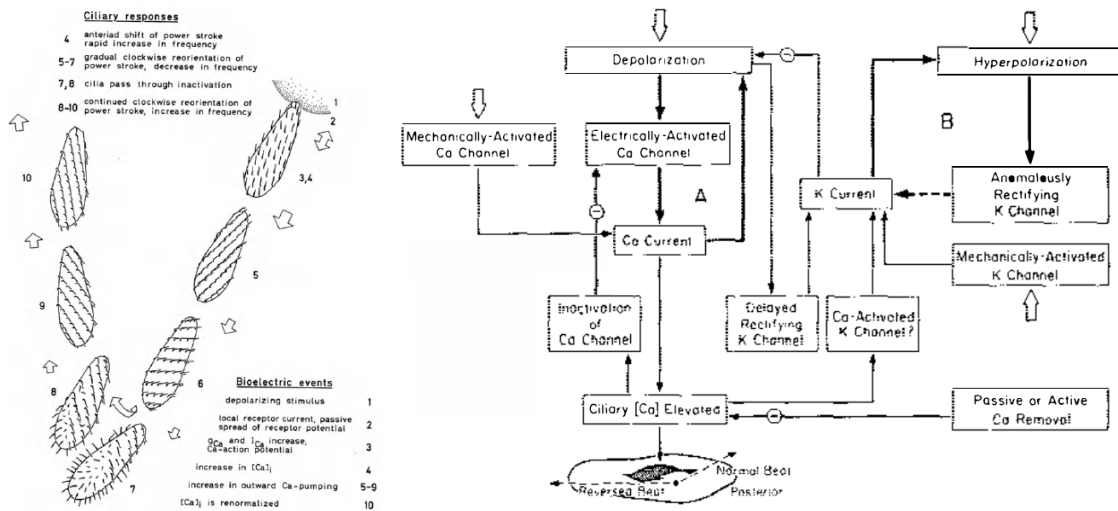


FIG. 1.8 Électrophysiologie de la réaction d'évitement. (A) Schéma d'une AR induite par la collision d'une paramécie avec un obstacle, avec les différentes étapes comportementales indiqués de 1 à 10, la direction et la taille des flèches codant pour la direction et la vitesse de nage. La fin du power stroke des cils est montré pour illustrer l'orientation des ondes métachronales, qui sont absentes pendant la période d'inactivité des cils (étapes 7,8) [14]. (B) Schéma montrant les différentes boucles de rétroaction basées sur les ions Ca^{2+} et K^+ donnant lieu à l'AR. Les boucles de rétroaction positives A et B sont indiquées en gras. La boucle A produit une réponse calcique dépolarisante tandis que la boucle B peut produire une réponse potassique hyperpolarisante, sous certaines conditions de concentration extracellulaire de K^+ . Les boucles de rétroaction négatives sont indiquées par un signe "-". La repolarisation (retour du potentiel membranaire à sa valeur de repos) peut être obtenue par : inactivation des canaux Ca^{2+} ciliaires par élévation locale de $[Ca^{2+}]_i$ et par courant K^+ . La figure est tirée de [53].

physiologie et le comportement n'a été développé chez *Paramecium*. Nous avons également développé au cours de cette thèse un dispositif microfluidique permettant d'immobiliser temporairement des cellules en nage libre. Ce dispositif consiste à aspirer les cellules contre un filtre micro-poreux dont les trous ont un diamètre bien inférieur à la taille des cellules [58]. Cette méthode facilite l'insertion de microélectrodes par comparaison avec les méthodes classiques (cf. méthode de la goutte inversée). C'est grâce à cette méthode que les mesures d'électrophysiologie, réalisées à l'Institut de la Vision, dans l'équipe de Romain Brette ont pu être faites.

Le Chapitre 3 présente ensuite une étude du comportement dans des environnements à obstacles contrôlés. Comment la paramécie interagit-elle au voisinage des obstacles ? Comment les AR sont-elles modulées par les paramètres géométriques des obstacles, l'angle d'incidence sur ceux-ci ou bien la vitesse de nage de l'organisme ? La paramécie a-t-elle une mémoire des chocs précédents ?

Le Chapitre 4 établit les conséquences à temps longs sur le transport : qu'est-ce que la AR apporte pour l'exploration spatiale d'environnements complexes ? Cette partie s'appuie sur des expériences dans des environnements avec obstacles à topologie et densité variées couplées avec des simulations numériques réalisées en collaboration avec Thibault Bertrand (Imperial College, London), permettant d'explorer une plus grande plage de paramètres et de géométries.

Enfin, cette thèse se termine dans le chapitre 5 par une conclusion et une description des projets en cours et des perspectives. En particulier, nous y présentons les premiers résultats d'une collaboration avec l'équipe d'Eric Meyer à l'IBENS pour identifier les canaux mécanosensibles de la paramécie, à ce jour, encore inconnus, en couplant expériences comportementales et manipulations génétiques de *Paramecium tetraurelia*. Nous montrons également des résultats préliminaires sur des expériences en 3D afin d'étudier à la fois la nage de la paramécie en environnement non-contraint et la dynamique tridimensionnelle de l'AR.

Chapitre 2

Comportement en nage libre

Contents

2.1	Matériels et méthodes	19
2.2	Dynamique locale d'une réaction d'évitement	40
2.3	Statistiques d'une trajectoire typique	48
2.4	Mouvement brownien	50
2.5	Modélisation électrophysiologique et cinématique	54

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Méthodes de culture

Les expériences ont été réalisées avec *Paramecium tetraurelia* WT (*wild type*) du stock 51 obtenues du laboratoire d'Eric Meyer, de l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure à Paris, France. Nous avons également utilisé des *Paramecium tetraurelia* mutantes de type *pawn*, obtenues de l'équipe "Réarrangement programmées du génome" dirigé par Mireille Bétermier à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) à Gif-sur-Yvette, France. Avec un apport constant de nourriture, les cellules de *Paramecium tetraurelia* restent dans la phase végétative de leur cycle de vie et, à une température de 27°C, se multiplient de manière asexuée par division binaire toutes les 6 h.

2.1.1.1 Préparation du milieu de culture WGP

Les paramécies sont cultivées dans une infusion d'herbe de blé tamponnée à pH 7.0, classiquement nommée WGP (wheat grass powder). Le protocole de préparation du WGP est décrit en détail dans l'annexe A.

2.1.1.2 Préparation du milieu bactérisé

Pour assurer un milieu nutritif suffisamment riche, un milieu de culture *bactérisé*, *i.e.* inoculé avec des bactéries est préparé à $J - 3$, où J est le jour de l'expérience. Sous hotte stérile à flux laminaire, une colonie isolée de *Klebsiella pneumoniae* non pathogène prélevée sur boîte de Pétri est inoculée dans un tube conique à centrifuge de 50 mL (Corning Falcon 50 mL Conical Centrifuge Tubes) contenant 5 mL de WGP stérile. Le milieu de culture est mis à incuber (*Incubating Mini Shaker*, VWR) sans agitation et à une température de 27°C pendant 24h.

2.1.1.3 Repiquage des paramécies

A $J - 2$, les paramécies sont transférées dans le milieu bactérisé. Pour ce faire, sous la flamme d'un bec bunsen (atmosphère semi-stérile), sont injectés dans 5 mL de milieu WGP bactérisé [59] :

1. 1 mL de *Paramecium tetraurelia* d'un ancien tube de culture (le plus récent par exemple), prélevée proche de l'interface liquide/air, là où les cellules sont concentrées, par un phénomène appelé gravitaxie [9, 39].
2. 1 μ L de β -sitosterol (4 mg/mL, préparé dans 100% d'éthanol), une molécule qui favorise la croissance des *Paramecium* et des bactéries *Klebsiella pneumoniae* [60].

Le nouveau tube de culture est replacé dans l'incubateur à 27°C sans agitation pendant 48h et laissé partiellement ouvert afin d'assurer l'oxygénation des cellules.

Il a été montré que le comportement de la paramécie, lorsqu'elle est exposée à un cycle jour/nuit, est gouverné par des cycles biologiques, comme le rythme circadien [61, 62, 63] et le rythme ultradien [64, 65, 63] qui ont pour effet de moduler la vitesse de nage et la fréquence d'AR au cours du temps, sur des périodes respectives de 24h et de 1h. Afin de nous affranchir de ces effets, la chambre d'incubation est plongée dans l'obscurité totale 24h/24.

Pour le simple maintien des cultures, ni le milieu bactérisé ni le contrôle en température ne sont nécessaires. Les paramécies sont simplement repiquées toutes les semaines dans du WGP stérile non bactérisé et laissées à température ambiante dans une pièce climatisée.

Lorsque les paramécies sont exposées à une faible température, leur métabolisme ralentit [44, 66]. Ainsi, pour une conservation à long terme, les tubes de culture sont entreposés à $T = 14^\circ\text{C}$ dans un environnement à température contrôlée (cave à vin, Russell Hobbs).

2.1.2 Préparation d'un échantillon

2.1.2.1 Préparation du milieu dilué

Le jour J , et avant chaque expérience (entendre l'acquisition d'un film pour une condition donnée), entre 400 et 600 μL de la suspension de *Paramecium tetraurelia* prélevée à la surface du tube de culture sont dilués dans 4 mL d'une solution inorganique à pH 7.2, composée de 1 mM CaCl_2 , 4 mM KCl and 1 mM Tris HCl. La préparation de ce milieu dilué a un triple objectif :

1. Laver les impuretés présentes dans le milieu de culture : biofilms, poussières, etc.
2. Se placer dans des conditions identiques aux expériences d'électrophysiologie réalisées à l'Institut de la Vision dans l'équipe de Romain Brette ainsi que dans une grande part de la littérature scientifique en électrophysiologie chez *Paramecium* [67, 53] qui nécessitent un contrôle ionique de la solution.
3. Contrôler la concentration des paramécies dans les chambres d'observation pour faciliter l'analyse d'image. Une concentration optimale en paramécies dans la chambre se situe entre 300 et 600 cellules/mL. Cela correspond à un optimum entre un grand nombre de trajectoires pour une meilleure statistique et un petit nombre d'erreurs et de corrections pendant l'analyse d'images induits par la mauvaise résolution des croisements entre objets. D'autre part, étant donné que nous nous intéressons à la nage individuelle de *Paramecium tetraurelia*, il est plus prudent de limiter la concentration en cellules pour s'affranchir d'interactions potentielles.

Afin de laisser les paramécies, cultivées à 27°C , s'adapter au changement de milieu, le tube de milieu dilué en paramécies est laissé environ 20 min à température ambiante $T_{amb} \simeq 25^\circ\text{C}$ sous lumière blanche.

2.1.3 Montage expérimental

2.1.3.1 Description de la chambre d'observation

La chambre d'observation, sauf mention contraire, est constituée d'un substrat fabriqué en élastomère de poly-diméthylsiloxane (PDMS) et consiste en une enceinte carrée délimitée par des murs de hauteur $h = 340 \mu\text{m}$ et de côté 30 mm qui définissent un volume accessible. Par la suite, ce type de chambre d'observation sera simplement appelé "piscine". Sa conception résulte d'une combinaison de techniques de micro-usinage et de moulage et est plus amplement décrite dans la section 3.1.1 intitulée "Conception des piscines à obstacles".

2.1.3.2 Traitement au plasma

Pour permettre un mouillage total entre la suspension de paramécies injectée et le substrat de PDMS naturellement hydrophobe, la piscine en PDMS subit un traitement au plasma d'oxygène dans une chambre à vide prévue à cet effet ($P \simeq 0.7$ mBar, temps d'exposition de 1 min).

L'idée du traitement au plasma est d'augmenter l'énergie de surface de l'objet traité afin d'augmenter sa capacité d'adhésion. Pour cela, la piscine est placée dans la chambre hermétique d'un four à plasma (Expanded Tabletop Plasma Cleaner, Harrick Plasma), et la pression est baissée à l'aide d'une pompe à vide primaire (IDP-3, Dry Scroll Vacuum Pump, Agilent Technologies) pour extraire l'air, jusqu'à une pression $P \simeq 0.7$ mBar. Du dioxygène est ensuite injecté dans la chambre à vide. La combinaison d'un apport en énergie et de la faible pression provoque l'ionisation du gaz qui devient un plasma. Les ions de plasma excités collisionnent avec la surface de l'objet, modifiant ses propriétés de surface. Plus précisément, la surface subit une oxydation et le bombardement d'ions de plasma forme des groupes hydroxyl sur la surface. La polarité de ces groupes permet l'attraction des molécules d'eau, également polaires, rendant la surface hydrophile.

2.1.3.3 Injection des paramécies

Immédiatement après, entre 400 et 600 μL de solution diluée en paramécies sont injectés dans la piscine. L'ensemble est refermé de manière hermétique en apposant une lamelle couvre-objet en verre dont le bon contact avec la surface supérieure des murs latéraux de la piscine est assuré en appliquant une légère pression avec la partie latérale d'une lame de microscopie en verre 75×25 mm. Cette étape a pour but de prévenir l'évaporation du milieu et de créer un environnement pseudo-2D topologiquement contrôlé. Dans cette configuration, les paramécies nagent librement et ne sont contraintes que par la surface supérieure en verre, la surface inférieure en PDMS ou les murs latéraux en PDMS, comme illustré par le schéma en Fig. 2.1.

2.1.3.4 Microscopie et acquisition des données

Une fois scellée, la piscine est déposée sur une plateforme à translation motorisée et imagée par le dessus avec un objectif à zoom variable (MVL12X12Z, Thorlabs) combiné à un tube d'extension 1.33X (Thorlabs, MVL133A), réglé en configuration "fort zoom" sur 1,5X (taille pixel = $l_\alpha = 3,81 \pm 0,01$ μm) ou "faible zoom" sur 0.58X (taille pixel $l_\alpha = 9,38 \pm 0,01$ μm). Les images sont enregistrées au format ".tiff" avec une caméra CMOS à haute vitesse et sensibilité (Blackfly S BFS-U3-51S5M-C, Flir, USA, 2448x2048 pixels², 10 bits, 75 images/s (fps) maximum) grâce à son logiciel dédié (Spinview, Flir,

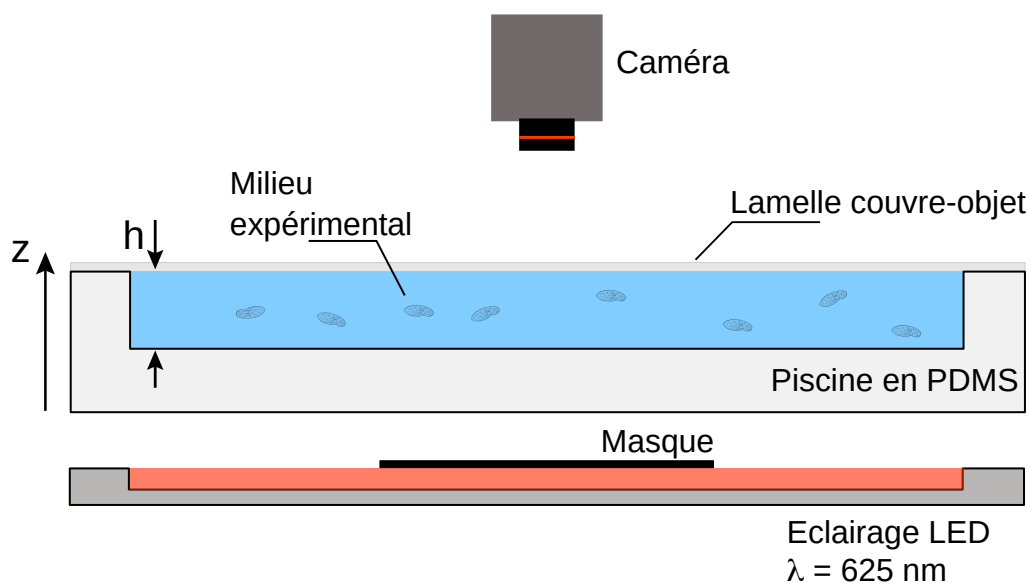


FIG. 2.1 Schéma du montage expérimental en nage libre (vue de côté). Le milieu contenant les paramécies est injecté dans une piscine en élastomère de PDMS. La piscine est scellée par une lamelle couvre-objet en verre et les paramécies sont éclairées en champ sombre grâce à un panneau à LED rouges ($\lambda = 625 \text{ nm}$) et imagée par le dessus avec une caméra à haute sensibilité et haute vitesse.

USA). Les images correspondent ainsi à un champ visuel de $9,30 \times 7,78 \text{ mm}^2$ ou bien $23,0 \times 19,2 \text{ mm}^2$ ¹. La piscine est éclairée en champ sombre, obtenue en plaçant environ 15 cm en dessous de la plateforme un panneau LED carré (EFFI-SBL, Effilux, France) sur lequel un masque opaque est positionné en son centre (Fig. 2.1). Les paramécies apparaissent comme des objets blancs sur fond noir. Le panneau LED émet une lumière rouge (longueur d'onde $\lambda = 625 \text{ nm}$) pour minimiser les effets phototactiques. En effet, bien que ceux-ci soient faibles, il a été montré que *Paramecium* modulait son activité locomotrice lorsqu'elle était exposée à de la lumière monochromatique pour différentes longueurs d'onde, et que ces effets étaient minimaux autour de $\lambda \simeq 600 \text{ nm}$ [49].

Généralement, une expérience consiste en un film de 20 000 images à fort zoom et à la fréquence d'acquisition $f_\alpha = 50 \text{ fps}$. Dans certains cas, un premier film de 10 000 images, à faible zoom et $f_\alpha = 35 \text{ fps}$ est enregistré, suivi immédiatement d'un film de 10 000 images, à grand zoom et $f_\alpha = 50 \text{ fps}$.

Les expériences se déroulent à $T_{amb} \simeq 25^\circ\text{C}$. Une sonde thermocouple (National Instruments, USB-TC01) est installée sur la plate-forme d'observation et la température au

1. Notons que le champ visuel de la caméra est plus petit que la taille de la piscine ($30 \times 30 \text{ mm}$) afin de mesurer uniquement la nage dans le volume et de s'extraire des effets de bord.

début de chaque acquisition est relevée.

Une fois l'acquisition du film (ou des 2 films) achevée, la piscine est vidée de son contenu, rincée à l'eau, séchée au pistolet de soufflage à air comprimé puis stockée jusqu'à prochaine utilisation. Une même piscine peut servir à plusieurs expériences. Lorsqu'elle est trop usée, une nouvelle piscine est moulée.

2.1.4 Traitement et analyse d'images

2.1.4.1 Compression des images

Les images brutes enregistrées lors des expériences étant volumineuses (environ 5 Mo/image), celles-ci sont compressées grâce à un script Matlab. Tout d'abord, un arrière-plan est calculé en prenant pour chaque pixel, le pixel d'intensité minimale sur les 100 premières images de la série. Ensuite, sur cet arrière-plan un seuil global d'intensité lumineuse est calculé grâce à la méthode du triangle [68] implémentée sous Matlab [69], basée sur l'histogramme de l'intensité des pixels, comme illustré en Fig. 2.2A. Enfin, pour chaque image, tous les pixels d'intensité inférieure au seuil sont mis à zéro et les autres sont inchangés. Cette méthode de compression permet de réduire la taille d'une image d'un facteur 20, tout en conservant une bonne résolution spatiale. La Fig. 2.2B et C montre une comparaison entre une image brute et une image compressée.

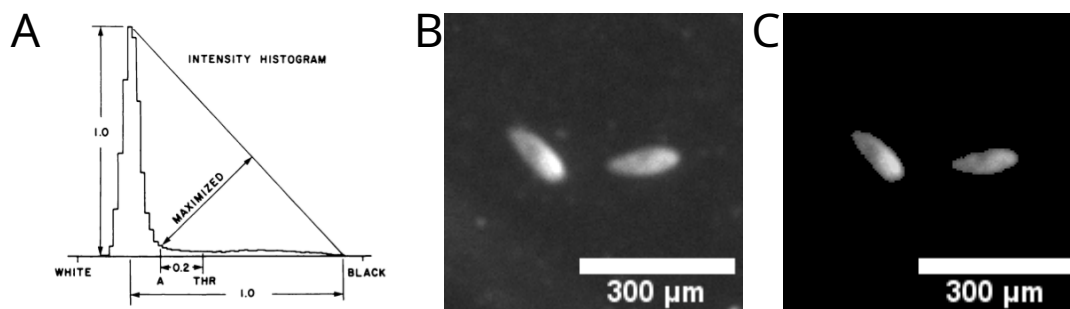


FIG. 2.2 Compression des images. (A) Schéma pour la détermination du seuil d'intensité global. Une ligne est construite entre le maximum et le minimum de l'histogramme le long de l'axe des niveaux de gris. La normale à cette ligne est calculée en chacun de ses points. Le niveau de gris correspondant à la normale de taille maximale est défini comme le seuil (adapté de [68]). (B) Image brute et (C) image compressée.

2.1.4.2 Suivi de trajectoires

Les trajectoires des paramécies sont obtenues grâce au logiciel libre de droits FastTrack [70], développé au Laboratoire Jean Perrin par Benjamin Gallois durant sa thèse. Les étapes nécessaires pour permettre un suivi de trajectoire optimal sont les suivantes :

1. Sélection d'une série d'images à analyser.
2. Calcul de l'arrière-plan, soit sur FastTrack selon différentes méthodes disponibles, soit en important un arrière-plan déjà calculé.
3. Seuillage.
4. Réglage des paramètres de détection : taille d'objet maximale et minimale pour sélectionner uniquement les objets d'intérêt, etc.
5. Réglage des paramètres de suivi.
6. Calcul des trajectoires.
7. Inspection visuelle des trajectoires et corrections manuelles des erreurs restantes. Typiquement, les croisements entre objets mal résolus sont corrigés à la main avec l'interface *Tracking Inspector* du programme.

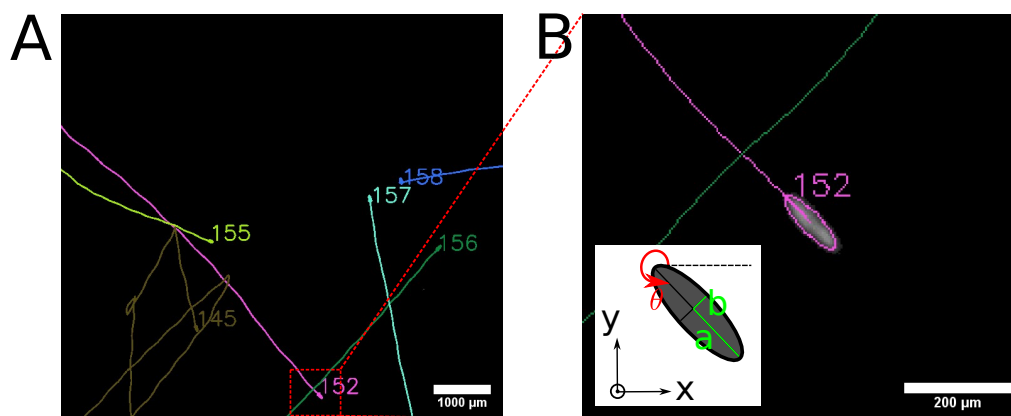


FIG. 2.3 Suivi de trajectoires sous *FastTrack*. (A) Capture d'écran de trajectoires (identifiées par un numéro) de paramécies en nage libre visualisées avec le logiciel d'analyse d'images *FastTrack* (échelle 1000 μm). (B) Zoom sur la trajectoire n°152 (échelle 200 μm). Encart : schéma d'une ellipse orientée, de demi-grand axe a , de demi-petit axe b et d'orientation θ .

L'extraction des paramètres cinématiques de chaque objet, comme la position du centre de masse (x, y) et l'orientation θ de l'axe principal de l'objet binarisé, est obtenue par *FastTrack* en calculant l'ellipse équivalente de chaque objet grâce à la méthode des

moments [71, 72]. Pour un objet binarisé composé de pixels repérés par les coordonnées (i, j) , le moment d'ordre (p, q) est défini par :

$$M_{p,q} = \sum_{i,j} i^p j^q \quad (2.1)$$

Le moment d'ordre zéro $M_{0,0}$ donne simplement le nombre total de pixels de l'objet, soit son aire. Les moments d'ordre 1 permettent d'obtenir les coordonnées du centroïde de l'objet :

$$x = \frac{M_{1,0}}{M_{0,0}} \quad y = \frac{M_{0,1}}{M_{0,0}} \quad (2.2)$$

Pour obtenir les paramètres de l'ellipse équivalente, comme le demi-grand axe a , le demi-petit axe b ou l'orientation du grand axe θ , il convient de définir les moments centrés d'ordre 2 :

$$\mu'_{2,0} = \frac{M_{2,0}}{M_{0,0}} - x^2 \quad \mu'_{1,1} = \frac{M_{1,1}}{M_{0,0}} - xy \quad \mu'_{0,2} = \frac{M_{0,2}}{M_{0,0}} - y^2 \quad (2.3)$$

Le demi-grand axe et demi-petit axe sont les vecteurs propres de la matrice de covariance de l'objet binarisé composé des moments centrés d'ordre 2. On a finalement :

$$a = \sqrt{2(\mu'_{2,0} + \mu'_{0,2}) + \sqrt{4\mu'^2_{1,1} + (\mu'_{2,0} - \mu'_{0,2})^2}} \quad (2.4)$$

$$b = \sqrt{2(\mu'_{2,0} - \mu'_{0,2}) + \sqrt{4\mu'^2_{1,1} + (\mu'_{2,0} - \mu'_{0,2})^2}} \quad (2.5)$$

$$\theta = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2\mu'_{1,1}}{\mu'_{2,0} - \mu'_{0,2}} \right) \quad (2.6)$$

L'orientation θ issue des moments de l'image est définie sur $[-\pi; \pi]$. Dans le cas d'un objet asymétrique, il peut être utile de déterminer l'orientation avant-arrière de l'objet dont l'information est par ailleurs contenue dans les moments d'ordre 3. Afin d'obtenir une orientation sur $[0; 2\pi[$, il suffit de projeter les pixels de l'objet sur le grand axe de l'ellipse équivalente et de calculer le coefficient d'asymétrie des distances de ces points projetés au centre de masse. Le signe de ce coefficient est un bon indicateur de l'asymétrie de l'objet le long de son axe principal.

Une autre caractéristique de FastTrack est qu'il a été pensé pour des objets déformables comme des poissons Zèbres dont on voudrait connaître l'angle entre la tête et la queue au cours du temps. Pour cela, le programme calcule l'ellipse équivalente pour la partie antérieure et pour la partie postérieure de l'objet et extrait les paramètres cinématiques de la même manière que décrite précédemment. Dans notre cas, nous utiliserons uniquement la position du centroïde de la partie antérieure et celle de la partie postérieure afin de définir l'orientation postérieur-antérieur de la paramécie qui nous sera utile par la suite.

Paramètres	Valeur ou méthode
Background	Importé : dernière image de la série
Binarization threshold	50
Maximal size	550
Minimal size	50
Maximal time (T)	50
Maximal distance (L)	50
Spot to track	Body
Normalization distance (D)	100
Normalization angle (A)	90

TABLE 2.1 – Paramètres utilisés pour le suivi de trajectoire sous FastTrack pour le jeu de données montré en exemple en Fig. 2.3, en grandissement "1,5X". Tous les paramètres non mentionnés sont laissés à leur valeur par défaut. La liste complète des paramètres est accessible sur le site internet de FastTrack (<https://www.fasttrack.sh/docs/setParam/>).

Pour appairer des objets à différents instants et ainsi obtenir une trajectoire, FastTrack calcule une fonction de coût basée sur 4 paramètres cinématiques (position, orientation, aire et périmètre). A chacun d'eux est associé un coefficient de normalisation choisi par l'utilisateur.

A l'issue de l'analyse, FastTrack fournit un fichier texte de 23 colonnes contenant les caractéristiques des objets suivis. Les plus importantes sont le numéro d'identification de la trajectoire, le numéro de l'image, la position du centre de masse et l'orientation ainsi que la longueur du demi-grand axe et demi-petit axe.

Un exemple de trajectoires en nage libre analysées et visualisées sous FastTrack est donné en Fig. 2.3A. La Fig. 2.3B est un agrandissement sur une des trajectoires, où l'on peut voir l'ajustement elliptique de l'objet, obtenu par la méthode des moments. L'encart montre un schéma d'une telle ellipse avec le grand-axe a , le petit axe b et l'orientation θ . Un choix typique de paramètres pour l'analyse sous FastTrack est listé dans le tableau 2.1.

Par la suite, la paramécie sera toujours assimilée à une ellipse de demi-grand axe $a = 68.5 \pm 7.7 \mu\text{m}$ et demi-petit axe $b = 29.4 \pm 4.4 \mu\text{m}$ (moyenne et écart-type sur $N = 5080$ paramécies).

2.1.4.3 Nettoyage des données

Les données sont ensuite traitées par des programmes Matlab écrits au cours de la thèse et qui appliquent différents filtres de correction et de nettoyage.

Tout d'abord, les trajectoires de moins d'une seconde sont retirées.

Nous définissons également la densité d'apparition d'un objet comme le nombre d'images sur lequel il apparaît, divisé par la durée entre sa dernière apparition et sa première apparition. Les objets dont la densité d'apparition est inférieure à 30 % sont retirés du jeu de données. Ne pas avoir d'information sur une paramécie pendant un laps de temps donné peut être problématique lorsque l'on s'intéresse à l'histoire de certains événements dans le passé.

Dans la même lignée, les objets immobiles pendant trop longtemps sont supprimés sur ces intervalles de temps. Pour cela, nous avons calculé la distance parcourue par un objet entre l'instant t et $t + \Delta t$, avec $\Delta t = 10$ images, choisi grand pour lisser les fluctuations et mettre en valeur les objets immobiles. Si cette distance est inférieure à un seuil $d_{thr} = 1.3$ pixels pendant une durée $T > T_{thr} = 25$ images, alors les données correspondants à cette durée sont retirées. Ces différents paramètres (Δt , d_{thr} , T_{thr}) ont été choisis après inspection minutieuse de trajectoires correspondant aux films à taille de pixel $l_\alpha = 9.38$ μm et fréquence d'acquisition $f_\alpha = 35$ fps. Ils sont ensuite normalisés par les quantités appropriées (l_α ou f_α) pour être indépendants de la fréquence d'acquisition et du niveau de grandissement du film considéré.

Pour retirer les objets détectés par FastTrack ne correspondant pas à des paramécies, le périmètre de l'ellipse équivalente s'est révélé être un critère pertinent. La distribution du périmètre moyen \bar{p} (moyenne temporelle) de l'ellipse équivalente d'une paramécie est une gaussienne de moyenne 322 μm et d'écart-type 40.8 μm ($R^2=0.95$, $N = 554$ trajectoires). Le périmètre typique des objets qui ne sont pas des paramécies est beaucoup plus grand. Après inspection, rejeter les objets dont le périmètre moyen est supérieur à 516 μm s'est avéré être un choix satisfaisant.

2.1.4.4 Exclusion des trajectoires circulaires

Dans un grand nombre d'expériences, nous avons pu observer des paramécies qui tournaient en rond (Fig. 2.4). L'apparition de mouvements circulaires a déjà été observé chez la bactérie *Escherichia coli*, due à des interactions de surface [73, 74]. Dans le cas de *Paramecium*, ce type de comportement a déjà été mentionné par des auteurs comme H. S. Jennings [75] ou S. Jung [21], mais aucune étude approfondie n'a été faite. Cette étude n'a pas non plus été l'objet de cette thèse, même si quelques observations quantitatives peuvent être faites. D'une part, les mouvements circulaires ont été observés lorsque la

paramécie nageait dans une solution inorganique et dans une solution de WGP. D'autre part, ce comportement a été observé à la fois lorsque la paramécie était confinée dans des piscines (interfaces PDMS et verre) ou dans des boîtes de Pétri retournées (interface de polystyrène cristal), ce qui suggère que le confinement plutôt que le type de matériau conditionne l'apparition de la nage circulaire. Une observation des paramécies nageant librement en 3D dans un grand volume serait nécessaire pour vérifier cette hypothèse (voir section 5.3).

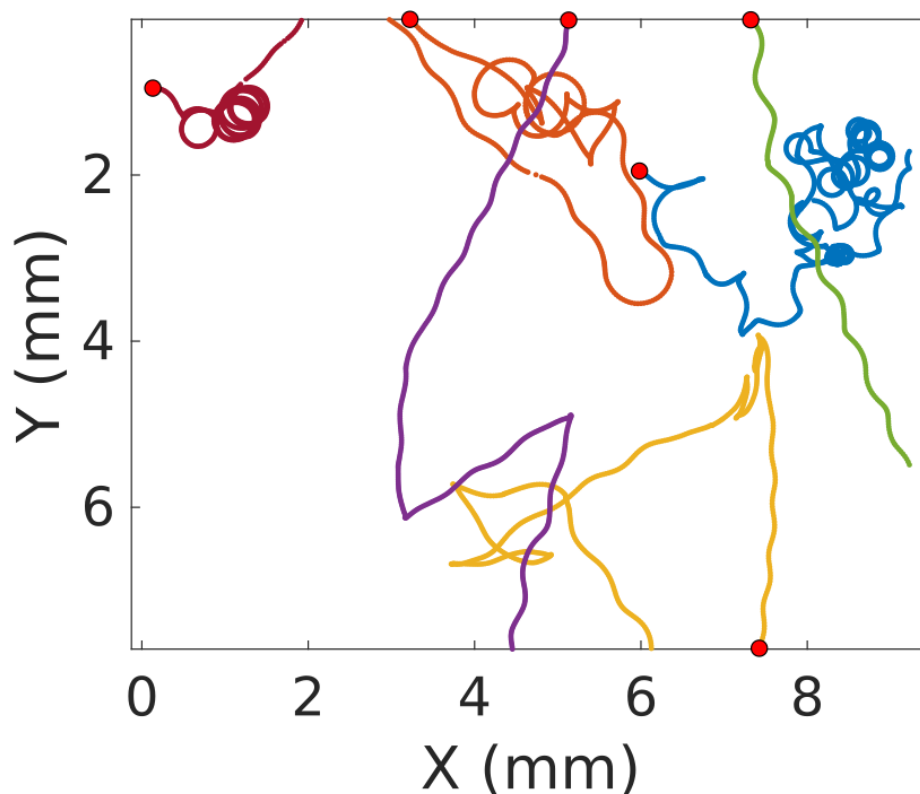


FIG. 2.4 *Trajectoires circulaires et trajectoires classiques de paramécies en nage libre. Les trajectoires bordeaux, rouge et bleue présentent des mouvements circulaires. Le cercle rouge marque le dernier instant de la trajectoire dans le champ d'observation.*

Ainsi, à partir de nos observations préliminaires, nous faisons l'hypothèse que ce comportement est lié au caractère pseudo-2D de nos chambres d'observation. Or, dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons au comportement des paramécies comme classiquement décrit dans la littérature, c'est-à-dire un mouvement hélicoïdal en ligne droite interrompu par des changements de direction. Nous avons donc retiré des données les

paramécies présentant ces mouvements circulaires.

Pour cela, nous utilisons une méthode dont la quantité élémentaire est $\theta(t)$, soit l'angle à l'instant t entre l'axe principal d'une paramécie donnée et l'axe horizontal, défini sur $[0, 2\pi]$. On considère le déplacement angulaire instantané, c'est-à-dire la différence $\Delta\theta(i) = \theta(i + 1) - \theta(i)$ où i est l'indice de l'image, grâce à la fonction Matlab `angdiff` pour les différences d'angles. Si sur un intervalle de temps donné, la paramécie tourne, par exemple, dans le sens anti-horaire, $\theta(t)$ croît et donc $\Delta\theta(t) > 0$ sur cet intervalle de temps. Pour classifier les types de trajectoires (hélicoïdale ou circulaire), il est donc pertinent de s'intéresser à la probabilité du signe de $\Delta\theta$. Dans le cas d'un mouvement hélicoïdal (Fig. 2.5A), la trajectoire 2D de la paramécie présente une alternance entre un sens de rotation horaire et anti-horaire, ce qui donne une probabilité $P(\text{sgn}(\Delta\theta))$ uniforme, ou bien $P(\Delta\theta > 0) \simeq 1/2$ (Fig. 2.5C). Inversement, dans le cas d'un mouvement circulaire (Fig. 2.5B), comme le sens de rotation est constant, on aura $P(\Delta\theta > 0) \simeq 1$ ou $P(\Delta\theta > 0) \simeq 0$ (Fig. 2.5D). En pratique il s'est avéré qu'une paramécie peut présenter à la fois des mouvements hélicoïdaux en ligne droite et des mouvements circulaires comme la trajectoire rouge de la Fig. 2.4. Cela rend la méthode énoncée ci-dessus pas complètement fiable. Les trajectoires circulaires candidates sont celles dont la distribution du signe de $\Delta\theta$ dévie suffisamment d'une loi uniforme. En pratique, nous conservons les trajectoires pour lesquelles $0.4 < P(\Delta\theta > 0) < 0.6$ tandis que celles pour lesquelles $P(\Delta\theta > 0) > 0.6$ ou $P(\Delta\theta > 0) < 0.4$ sont inspectées visuellement une à une à l'aide d'un programme MATLAB : celles qui présentent des mouvements circulaires sont retirées des données, les autres sont conservées.

2.1.4.5 Correction des inversions arrière-avant

Il arrive que pendant une courte période de temps, l'orientation arrière-avant (ou postérieur-antérieur) de la paramécie ne soit pas bien détectée par FastTrack. Cela peut être dû à la modification transitoire de la forme apparente de l'objet détecté, due à une interaction avec une impureté dans le milieu ou avec un autre objet, ou encore à une réorientation hors du plan. Cette erreur est critique puisque l'orientation de la paramécie est ce qui permet de détecter les AR. Le programme `CorrectOrientationInversion.m` vise à identifier et corriger les intervalles de temps sur lesquels ces erreurs se produisent et est structuré en 3 étapes :

1. Calculer une version modifiée du tableau des déplacements angulaires instantanés $\Delta\theta(i) = \theta(i + 1) - \theta(i)$ pour mieux détecter les inversions ;
2. Trouver les intervalles de temps sur lesquels ces inversions se produisent ;
3. Inverser dans les données brutes la position de l'avant et de l'arrière sur les intervalles

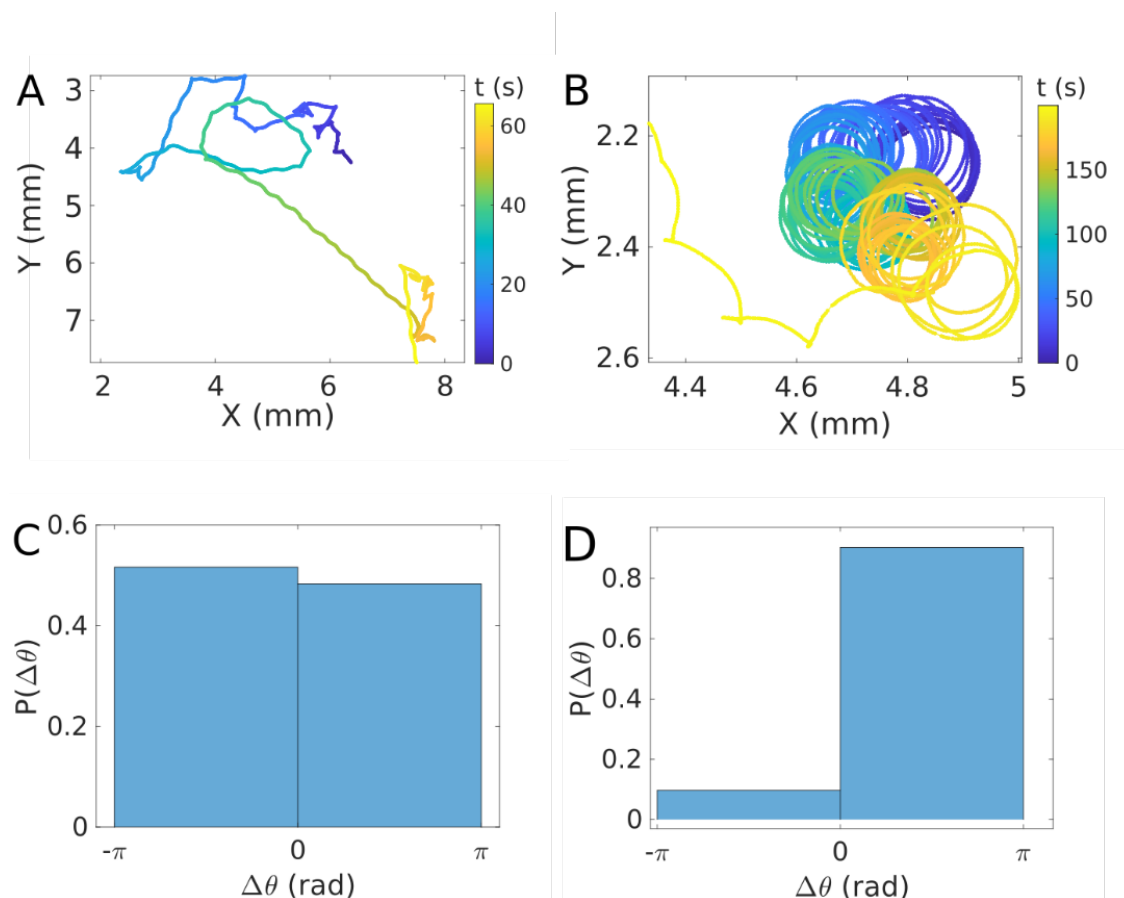


FIG. 2.5 *Détection des trajectoires circulaires. (A) Trajectoire classique d'une paramécie en nage libre avec le mouvement hélicoïdal et quelques réactions d'évitement visibles. Le temps en secondes est indiqué en couleur. (B) Trajectoire circulaire d'une paramécie en nage libre. (C) et (D) Probabilité relative du signe du déplacement angulaire instantané pour les trajectoires montrées respectivement en (A) et (B).*

déTECTÉS.

Étape 1. Considérons que l'objet est bien résolu à l'instant $i - 1$ mais que son orientation s'inverse à l'instant i et reste inversée pendant une durée T . La signature de cette inversion est alors donnée par $\Delta\theta \simeq 180^\circ$ à l'instant $i - 1$ (juste avant l'inversion) et à l'instant $i - 1 + T$ (dernier instant avant le retour à la bonne orientation). Toutefois, si $\Delta\theta$ n'est pas défini sur l'un de ces instants, la signature de l'inversion est partiellement cachée, ce qui la rend impossible à détecter. Cela peut être dû à 2 raisons : (i) s'il n'existe pas de données à l'instant $i + 1$ (e.g. image manquante), $\Delta\theta(i - 1)$ calculé avec un pas constant de 1 image n'est pas défini ; (ii) si la paramécie se réoriente hors du plan (lorsque

l'excentricité $e(t)$ de l'ellipse passe en dessous d'un certain seuil, *i.e.* $e(t) < e_{thr} = 0.75$, voir section 2.2.3) pendant une durée T' , l'orientation arrière-avant fluctue beaucoup car la forme apparente de l'objet détecté passe d'une ellipse à un cercle. Dans ce cas, $\Delta\theta$ n'est pas défini. Dans le cas (i), le déplacement angulaire instantané à l'instant i est calculé entre i et la prochaine valeur angulaire disponible, disons $i + 2$: $\Delta\theta(i) = \theta(i + 2) - \theta(i)$. Et de manière similaire pour le cas (ii) : $\Delta\theta(i) = \theta(i + T' + 1) - \theta(i)$. En d'autres termes, dans ces cas particuliers, le pas de temps pour le calcul de $\Delta\theta$ n'est pas gardé constant. On suppose que $\theta(i)$ varie peu sur quelques images.

Enfin, les instants correspondants à une inversion sont calculés. On remarque que $\Delta\theta$ est distribuée selon une loi gaussienne de moyenne nulle et d'écart-type σ ainsi que deux faibles pics autour de $\pm 180^\circ$. Un choix prudent pour la détection des inversions est de couper à quelques σ . Un bon choix s'est avéré être $d\theta_{thr} = 20^\circ$. On s'est assuré qu'une paramécie nageant dans des conditions normales ne peut avoir $\Delta\theta > 20^\circ$ entre deux instants successifs (soit 20 ms).

Étape 2. Si au cours d'une trajectoire, 4 inversions sont détectées à $t = t_1, t_2, t_3, t_4$ les intervalles durant lesquelles les orientations sont incorrectes peuvent être $[t_1, t_2]$ et/ou $[t_2, t_3]$ et/ou $[t_3, t_4]$. Pour déterminer quel est le bon intervalle parmi ces différentes possibilités, les intervalles successifs sont comparés 2 à 2 (par exemple $I_a = [t_1, t_2]$ et $I_b = [t_2, t_3]$) et pour chaque intervalle, la moyenne temporelle de l'angle $\alpha(t)$ entre le vecteur arrière-avant détecté et le vecteur vitesse instantanée est calculé. Si l'inversion se produit en I_a et pas en I_b , on s'attend à $\bar{\alpha}_a(t) > \bar{\alpha}_b(t)$. Un seuil sur cet angle est aussi ajouté pour s'assurer que les intervalles considérés correspondent bien à un évènement d'inversion. Si $\bar{\alpha}_a(t) < \alpha_{thr} = 90^\circ$, l'intervalle ne contient pas d'inversion. On verra plus tard que c'est ce même seuil qui est utilisé pour la détection des nages arrières durant une AR.

Étape 3. Il suffit simplement d'inverser dans les données brutes les coordonnées du centroïde de la partie antérieure et celles de la partie postérieure de la paramécie sur les intervalles de temps correspondant à une inversion détectée.

2.1.5 Effet du milieu de culture sur la croissance et la vitesse des paramécies

L'étude de la croissance de la paramécie en fonction des paramètres physico-chimiques (température, pH, densité de nutriments, etc) de son milieu de culture est présente dans la littérature d'écotoxicologie [76], mais ne correspond pas précisément à notre protocole expérimental.

Ainsi, au moment de mettre en place notre protocole expérimental tel que décrit dans

la section *Méthodes de cultures*, nous avons voulu quantifier les effets sur la croissance et la vitesse de nage de la paramécie de deux paramètres : concentration en nutriments (WGP et WGP dilué 2 fois) et en bactéries (avec ou sans inoculation de *Klebsiella pneumoniae* dans le milieu de culture). Est-ce qu'un milieu moins infusé en WGP induit une plus faible croissance des paramécies ? Est-ce qu'une paramécie dans un environnement riche en bactéries nage plus vite ?

2.1.5.1 Croissance des bactéries

Tout d'abord, quelle est l'influence du WGP sur la croissance des bactéries ? Après inoculation des bactéries dans 5 mL de WGP (dilué et non dilué) et incubation à 27°C pendant 20h, 1 mL de solution est prélevé et la Densité Optique (DO) à 600 nm est mesurée avec un spectrophotomètre (BioPhotometer Model #6131, Eppendorf). Pour chaque condition, 2 échantillons sont préparés et les mesures sont données dans le tableau 2.2. En moyenne, doubler la concentration en WGP induit une DO 5x plus élevée au bout d'environ 24h.

WGP dilué		WGP non dilué	
0,025	0,014	0,112	0,101

TABLE 2.2 – Densité optique à 600 nm pour 2 concentrations en WGP différentes. La solution de 5 mL de WGP inoculée avec *Klebsiella pneumoniae* est mise à incuber à 27°C sans agitation pendant 20h. Pour chaque condition (WGP dilué et non dilué), 2 échantillons sont préparés et une mesure de DO par échantillon est réalisée.

2.1.5.2 Croissance des paramécies

Pour étudier l'impact de la concentration en nutriment et de la concentration en bactéries sur la concentration en paramécies, nous avons suivi le même protocole et montage expérimental que ceux décrits dans la section 2.1.6. Pour chaque combinaison de paramètres, 5 expériences sont réalisées. Parmi celles-ci, 3 correspondent à des paramécies prélevées dans leur milieu de culture au bout d'une durée de $T_{age} = 26$ heures (qu'on peut appeler "âge" par abus de langage) et observées grâce à un film de 400 images à 40 fps. Les 2 autres correspondent à $T_{age} = 90$ heures, et à un film de 700 images à 70 fps.

La concentration est mesurée à partir du nombre moyen d'objets par image obtenu à l'issue du suivi de trajectoires en analyse d'images, qui est une approximation du nombre de paramécies dans la solution. La moyenne est calculée sur toute la durée du film. Pour

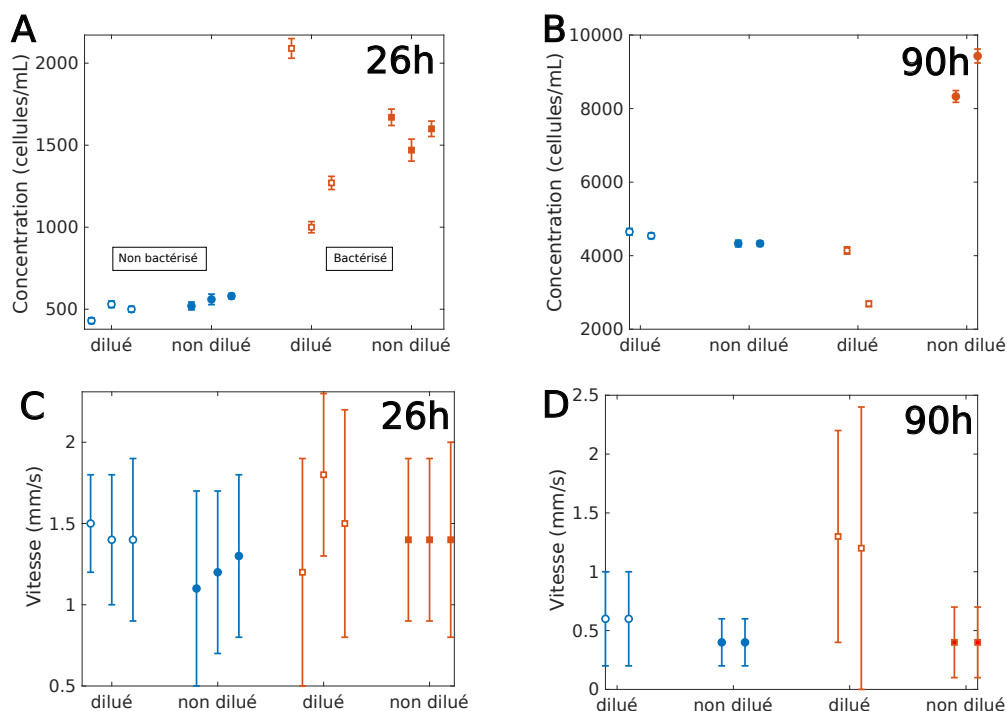


FIG. 2.6 *Etude des milieux.* (A) et (B) Concentration moyenne et écart-type de paramécies en nombre de cellules/mL, par expérience, et pour un âge de cellules respectif de $T_{age} = 26h$ et $T_{age} = 90h$. (C) et (D) Vitesse moyenne de paramécies en mm/s, par expérience, et pour un âge de cellules respectif de $T_{age} = 26h$ et $T_{age} = 90h$. Chaque point représente une expérience. Les disques bleus vides et pleins représentent respectivement des paramécies dans du milieu WGP dilué et non dilué, sans inoculation de bactéries. Les carrés rouges vides et pleins représentent respectivement des paramécies dans du milieu WGP dilué et non dilué, avec inoculation de bactéries.

obtenir une concentration de cellules par mL, il suffit ensuite de diviser le nombre moyen d'objets par image par le volume de solution injectée dans la chambre, soit 0,1 mL.

On observe sur la Fig. 2.6A,B que dans un milieu non bactérisé, la concentration en paramécies ne dépend pas de la concentration en WGP. A $T_{age} = 26h$, la concentration en paramécie est plus grande environ d'un facteur 1.5 dans le WGP non dilué par rapport au WGP dilué 2 fois. Cela semble se renforcer avec l'âge du milieu où ce facteur varie entre 2 et 3 au bout de $T_{age} = 90h$. On observe également à $T_{age} = 26h$, que la concentration en paramécies est triplée lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu avec inoculation de bactéries, mais sans dépendance avec la concentration en WGP.

2.1.5.3 Vitesse de nage des paramécies

Enfin, nous avons voulu comprendre si les différences de milieu de culture pouvaient avoir une influence sur le comportement. Pour cela, nous avons mesuré la vitesse instantanée des paramécies à partir des données issues de l'analyse d'image. La vitesse selon l'axe x à l'instant t vaut $v_x(t) = (x(t + \Delta t) - x(t))/\Delta t$ où $\Delta t = 1$ image (idem pour v_y). La norme de la vitesse vaut $v(t) = \sqrt{v_x^2(t) + v_y^2(t)}$. Pour chaque expérience, on calcule la vitesse moyennée sur toutes les trajectoires et tous les temps ainsi que l'écart-type à la moyenne.

On observe sur la Fig.2.6C, D qu'en prenant en compte l'écart-type, la vitesse ne diffère pas selon que les paramécies sont cultivées dans du WGP dilué ou non dilué ou bien avec et sans inoculation de bactéries dans le milieu.

En conclusion, on utilisera du WGP non dilué et bactérisé car à vitesse égale, c'est le milieu dans lequel les paramécies sont le plus concentrées.

2.1.6 Étude des effets d'adaptation

Les paramécies vivent à l'état naturel dans des environnements inhomogènes et peuvent être exposées à diverses compositions ioniques et à diverses températures. Ces changements environnementaux peuvent affecter leur comportement. En particulier, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en potassium entre le milieu de culture et le milieu expérimental peut inhiber le déclenchement des AR à travers l'inactivation des canaux calciques présents dans les cils [77]. Au bout de quelques heures, le comportement de la paramécie - caractérisé par exemple par sa vitesse de nage - redevient celui qu'elle avait avant d'être transférée dans le milieu expérimental [78]. Ce phénomène d'adaptation se retrouve également avec un changement de la température. Lorsque des paramécies sont transférées dans un milieu dont la température diffère de la température de culture, leur vitesse et leur fréquence d'AR changent fortement à temps court (quelques minutes), avant de s'adapter et de retourner à l'état initial [79] [80]. Ce phénomène s'explique par un changement des propriétés électrophysiologiques, en particulier la conductance des canaux calciques [8].

Dans le cadre de nos expériences avec *Paramecium tetraurelia*, observons-nous de tels effets d'adaptation? Nous avons voulu quantifier ces effets à temps long (sur plusieurs heures) en comparant 3 milieux expérimentaux :

1. la solution inorganique, composée de 1 mM CaCl_2 , 4 mM KCl, 1 mM TrisHCl à pH 7.2;

2. une solution Dryl [81], composée de 2 mM Sodium citrate, 1 mM NaH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM CaCl_2 ;
3. la solution WGP composée d'une infusion d'herbe de blé et d'une solution tampon (détails en annexe A).

La solution expérimentale est composée de 4 mL d'une des solutions ci-dessus avec 350 μL de paramécies prélevées à la surface du tube de culture préparé 48h avant.

Les paramécies sont cultivées à 27°C dans l'obscurité et la solution est préparée à température ambiante puis injectée immédiatement dans la chambre d'observation. Toute l'expérience se déroule à température ambiante, mesurée à environ 22°C à l'aide d'une sonde thermocouple.

La chambre d'observation (Fig. 2.7B) consiste en une petite boîte de Pétri (CELL-STAR Cell Culture Dish, 35x10 mm). Juste avant le début de l'acquisition, 100 μL de solution de paramécies est déposé au centre de la face interne du couvercle de la boîte de Pétri, puis le tout est recouvert par l'autre partie de la boîte (face externe vers le bas) [82]. Cette configuration crée un environnement pseudo-2D, sous forme d'un disque de diamètre moyen 11 mm et d'épaisseur h dans lequel les paramécies nagent librement (Fig. 2.7C). Les paramécies sont uniquement contraintes par les bords de la goutte ou par la surface supérieure ou inférieure de la boîte. La hauteur de confinement h est estimée en mesurant le diamètre de la surface projetée de la goutte. En connaissant le volume de la goutte (100 μL), il est possible d'en déduire son épaisseur entre les faces de la boîte de Pétri, égale à environ $h = 450 \mu\text{m}$, en accord avec une mesure réalisée au pied à coulisse à 500 μm . L'objectif utilisé est un Navitar 12X réglé sur 0.58X, fixant une taille de pixel $l_\alpha = 9.73 \mu\text{m}$, sur lequel est monté une caméra BlackFly (la même que celle décrite en section 2.1.3. A chaque acquisition, 900 images sont acquises à une fréquence $f_\alpha = 30 \text{ fps}$.

Pour chaque milieu (Inorganique, Dryl, WGP), 2 échantillons sont préparés et un film est enregistré toutes les 24 minutes par échantillon.

Au cours des expériences, nous avons souvent observé des paramécies qui s'immobilisaient temporairement. Nous avons essayé de quantifier cet effet à l'aide de l'algorithme de détection des objets immobiles, décrit dans la section 2.1.4. Pour chaque film, la durée totale pendant laquelle des objets détectés sont immobiles est calculée et divisée par le temps d'observation total pour obtenir une fraction temporelle d'objets immobiles. Dans le cas du milieu inorganique, on observe une augmentation marquée d'immobilisation des paramécies. A $t = 0$, il n'y a presque pas de paramécies immobiles alors qu'à $t = 180 \text{ min}$,

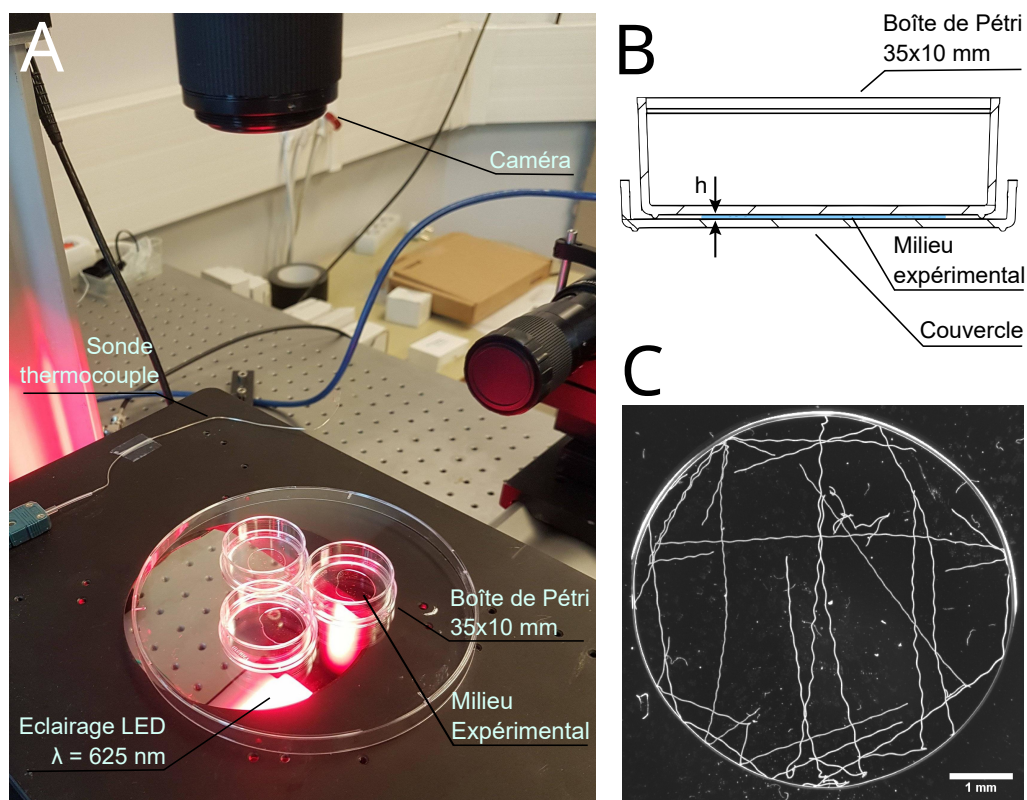


FIG. 2.7 Montage expérimental pour l'étude de l'adaptation. (A) Photographie du montage expérimental, similaire au montage principal décrit dans les *Matériels et Méthodes*, montrant 3 échantillons éclairés en champ sombre et imagés par le dessus. La température à chaque acquisition est mesurée grâce à une sonde thermocouple placée à côté des échantillons. (B) Schéma en vue de côté de la chambre expérimentale constituée d'une boîte de Pétri et son couvercle qui enferment $100 \mu\text{L}$ de solution de paramécies, confinée sur une hauteur $h \simeq 500 \mu\text{m}$. (C) Image en champ sombre de trajectoires de paramécies obtenue en sommant les 900 images à 30 fps composant une acquisition. La barre d'échelle est de 1 mm.

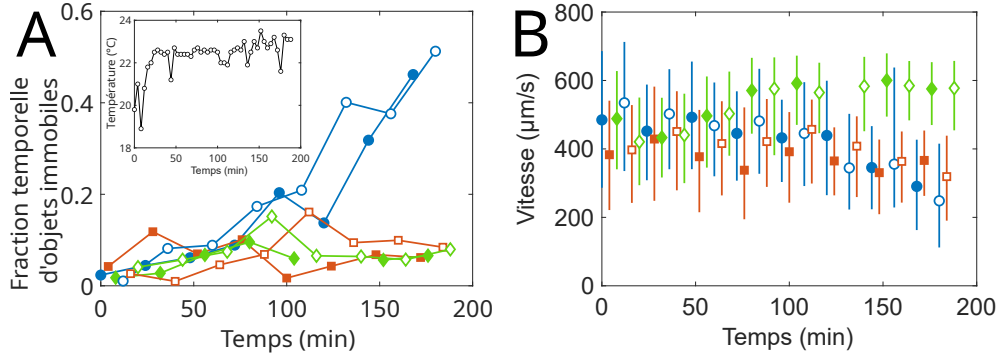


FIG. 2.8 *Etude de l'adaptation.* (A) Fraction temporelle d'objets immobiles au cours du temps et pour chaque condition. Les symboles pleins et vides correspondent respectivement au premier et second échantillon de chaque condition. Encart : température au cours du temps, mesurée au début de chaque acquisition à l'aide d'une sonde thermocouple. (B) Vitesse médiane des paramécies non-immobiles au cours du temps et pour chaque condition. Les barres d'erreur représentent les quartiles inférieurs et supérieurs. Les symboles ronds et bleus, carrés et rouges et losanges et verts correspondent respectivement au milieu Inorganique, Dryl et WGP.

environ 50 % du temps d'observation total est composé de paramécies immobiles, et ce pour les 2 mesures indépendantes (symboles bleus pleins et vides de la Fig. 2.8A). Pour le milieu Dryl et WGP, il n'y a pas d'augmentation nette observée, mais une fluctuation autour de 5-10 %. Cet effet d'immobilisation dépend donc du type de milieu utilisé, ce qui élimine partiellement une immobilisation d'origine mécanique, comme une interaction avec des impuretés ou avec les parois de l'environnement, bien qu'elle puisse coexister avec une autre cause et justifier les fluctuations de base observées pour le Dryl et le WGP. De plus, les immobilisations ont également été observées dans les piscines en PDMS. Cela tend à confirmer que le type de matériau utilisé (polystyrène cristal pour les boîtes de Pétri et PDMS/verre pour les piscines), en première approximation, n'a pas d'influence sur les immobilisations. Nous ignorons pourquoi cet effet était beaucoup plus marqué dans le milieu inorganique. Enfin, nous n'avons pas cherché à approfondir les causes de cette immobilisation.

Nous avons également quantifié la vitesse des paramécies au cours du temps. Pour cela, nous avons retiré les intervalles de temps pendant lesquels les paramécies étaient immobiles pour se concentrer uniquement sur celles qui nageaient à vitesse non nulle. A chaque acquisition, la norme de la vitesse instantanée de toutes les paramécies est calculée, selon $v(t) = \sqrt{v_x(t)^2 + v_y(t)^2}$ avec $v_i(t) = (i(t + \Delta t) - i(t))/\Delta t$ où $i = x, y$

et $\Delta t = 33$ ms. Pour quantifier la vitesse typique des paramécies d'un échantillon, nous avons calculé la vitesse instantanée médiane ainsi que les quartiles inférieurs et supérieurs. Nous pouvons observer sur la Fig. 2.8B une diminution de la vitesse au bout d'environ 2h pour le milieu Inorganique et Dryl, passant d'environ 500 $\mu\text{m/s}$ à $t = 0$ min à environ 250 $\mu\text{m/s}$ au bout de $t = 180$ min. Toutefois, les barres d'erreur se superposent encore entre ces deux instants, ce qui indique que les distributions de vitesse restent relativement proches, malgré une diminution de la valeur médiane. Quant au milieu WGP, la vitesse reste plutôt constante autour de 500 $\mu\text{m/s}$ avec des fluctuations d'amplitude 100 $\mu\text{m/s}$.

En conclusion, nous avons quantifié les effets de différents milieux, à la fois inorganiques (solution inorganique et Dryl) et WGP, sur la motilité des paramécies pendant une durée de 3h. Contrairement à la littérature sur le sujet, effectuée principalement sur *Paramecium caudatum*, les effets que nous observons sur notre espèce *Paramecium tetraurelia* sont relativement faibles. En effet lorsque, dans les expériences d'Oka *et al.*, une paramécie est transférée d'une solution inorganique à une autre solution inorganique à concentration de potassium différente, une augmentation brutale de la vitesse est observée [78]. Nous n'observons pas un tel effet dans notre cas au moment du transfert dans une solution différente (WGP vers Inorganique et WGP vers Dryl, respectivement symboles bleus et rouges de la Fig. 2.8B), puisque la vitesse à $t = 0$ est d'environ 500 $\mu\text{m/s}$ soit la vitesse typique de paramécies en nage libre. Cela est possiblement dû à une proximité dans la composition ionique entre le milieu de culture et le milieu expérimental. Nous observons une vitesse constante lorsque le milieu de culture et expérimental sont les mêmes (losanges verts, Fig. 2.8B). Dans le cas des solutions inorganiques (ronds bleus et carrés rouges, Fig. 2.8B), la vitesse ne diminue qu'au bout de 3h lorsque le milieu devient pauvre en nutriments. Un autre effet observé est l'immobilisation des paramécies dans le milieu inorganique principalement, qui augmente avec le temps et dont la cause reste inconnue. Cet effet n'a pas été évoqué dans la littérature sur les phénomènes d'adaptation, et il n'est d'ailleurs pas clair si la diminution de vitesse que les auteurs observent est due à l'immobilisation d'une partie des paramécies, qui tendrait à baisser globalement la vitesse moyenne de toute la population.

Ces observations confirment donc la validité de notre protocole principal qui consiste à imager des paramécies environ 20 min après transfert dans le milieu inorganique. En effet, sur cette durée, les effets de vitesse et d'immobilisation restent relativement faibles et indiscernables des mesures faites dans les autres milieux. Pour cette raison, le milieu Inorganique sera quand même celui utilisé au cours de toutes nos expériences.

Toutes ces étapes nous auront permis de nous assurer de la validité des méthodes expérimentales et des analyses. Cela nous permet ainsi de rentrer plus en détail dans le comportement des paramécies, à commencer par la réaction d'évitement (*Avoiding Reaction*, AR).

2.2 Dynamique locale d'une réaction d'évitement

2.2.1 Détection des AR

Dans notre analyse, une AR est détectée si et seulement si sont détectées une nage arrière suivie d'une réorientation. Bien que nous ayons observé des réorientations non précédées d'une nage arrière (Fig. 6E de notre article [56]), celles-ci n'étaient pas en nombre important, et par difficulté d'analyse (seul le critère angulaire de détection fonctionnerait, voir ci-dessous), nous ne les avons pas prises en compte.

Une nage arrière est détectée lorsque le vecteur mouvement unitaire $\hat{\mathbf{m}}(t) = \mathbf{m}(t)/|\mathbf{m}(t)|$ et le vecteur orientation unitaire $\hat{\mathbf{o}}(t) = \mathbf{o}(t)/|\mathbf{o}(t)|$ pointent dans des directions opposées, c'est-à-dire lorsque $\mathbf{m}(t) \cdot \mathbf{o}(t) < 0$. Le vecteur mouvement $\mathbf{m}(t)$ est simplement égal au vecteur vitesse instantanée pris entre deux instants successifs ($\Delta t = 1/f_\alpha = 20$ ms) et le vecteur orientation $\mathbf{o}(t)$ est calculé entre le centroïde de la partie antérieure et le centroïde de la partie postérieure de la paramécie, donnés par la méthode d'ajustement à deux ellipses prévue par FastTrack dans le cas d'objets déformables (section 2.1.3, Suivi de trajectoires). Les nages arrières détectées dont la durée est de $1/f_\alpha$ ou moins, sont considérées comme due à des fluctuations de \mathbf{m} ou de \mathbf{o} et sont rejetées.

La phase de réorientation est définie comme l'intervalle de temps depuis le début de la nage arrière pendant lequel $|\omega(t)| < \omega_{thr}$, où $\omega(t) = \theta(t + \Delta t) - \theta(t)$ est la vitesse angulaire, avec $\Delta t = 1/f_\alpha = 20$ ms. Le seuil $\omega_{thr} = 150$ °/s est choisi empiriquement après différents choix appuyés par des inspections visuelles d'AR. Les réorientations d'une durée inférieure ou égale à $2/f_\alpha = 40$ ms sont rejetées.

En réalité, les AR sont complexes et peuvent dévier de la description typique qu'on en fait : réorientation sans nage arrière, très longue réorientation, AR 3D hors du plan d'observation, seconde AR qui se déclenche pendant la phase de réorientation de la précédente, etc. La méthode développée dans cette thèse n'est pas parfaite et ne prend en compte que le cas typique décrit au début de la section. Cette approche prudente privilégie les faux négatifs (pas d'AR détectée alors qu'il peut y en avoir une en réalité) aux faux positifs (AR détectée alors qu'il n'y en a pas en réalité). Toutefois, cette méthode produit quand même des faux positifs, qui sont généralement de deux types :

- **Inversion avant-arrière.** Lorsque la paramécie présente peu d'asymétrie avant-arrière ou lorsque la résolution optique est insuffisante, FastTrack détecte mal l'orientation de l'objet, ce qui résulte en une mauvaise identification avant-arrière de la paramécie.
- **Fluctuation du vecteur mouvement.** Lorsque la vitesse de nage de la paramécie est très faible, le vecteur mouvement est peu fiable et son orientation fluctue aléatoirement. Il est alors en pratique difficile de distinguer avec le critère d'anti-alignement une nage arrière d'une paramécie immobile.

Ces deux erreurs ont pour conséquence une détection (à tort) d'une nage arrière. Dans le premier cas, les inversions sont corrigées grâce à un programme Matlab (section 2.1.4, "Correction des inversions arrière-avant"). Dans le second cas, la norme du vecteur mouvement est prise en compte. Les AR dont la nage arrière se produit à une vitesse inférieure à 100 $\mu\text{m/s}$ sont considérées comme des faux positifs et sont rejetées. Le choix de ce seuil ainsi que la quantification de ces erreurs et de leur résolution ont été faits sur un jeu de données en nage libre correspondant à des paramécies mutantes de type *pawn* incapable de produire une AR. Ce jeu de données est composé de 68 trajectoires pour une durée d'observation totale de 888 s. Avant application des corrections, 54 AR sont détectées dont 26% (14/54) sont dues à la première erreur et 74% (40/54) sont dues au second type d'erreur. Après correction, plus que 4 AR sont détectées. Cela correspond à une fréquence de AR de 0.0045 Hz, inférieure de 2 ordres de grandeur à la fréquence d'AR en nage libre de paramécies de type sauvage, égal à environ 0.20 Hz (voir section 2.2.4, "Statistiques des AR"). Cela permet de confirmer la qualité des programmes d'analyse des AR quant aux faux positifs. Nous n'avons pas quantifié les faux négatifs.

2.2.2 Description comportementale d'une AR

Une réaction d'évitement peut se décomposer en 4 étapes : interruption de la nage avant ; nage arrière en ligne droite ; réorientation autour de la partie postérieure ; reprise de la nage avant. La Fig. 2.9A montre un exemple de réaction d'évitement spontanée (SAR) dans un environnement sans obstacles. L'image est acquise en champ sombre et représente 6 instants de la SAR séparés par 200 ms chacun.

La nage arrière débute après une forte décélération, environ 100 ms avant l'immobilisation à $t = 0$, comme montré sur la Fig. 2.9B. La nage arrière se caractérise par un anti-alignement entre le vecteur mouvement $\hat{\mathbf{m}} = \mathbf{m}/|\mathbf{m}|$ et le vecteur orientation $\hat{\mathbf{o}}$, et correspond aux régions rouge clair et violet clair de la Fig. 2.9D. Après quelques instants de nage arrière en ligne droite, le mouvement de rotation débute et gagne en amplitude jusqu'à atteindre une vitesse angulaire maximale, $|\omega(t = 0.18 \text{ s})| \simeq 800 \text{ }^\circ/\text{s}$ (Fig. 2.9C)

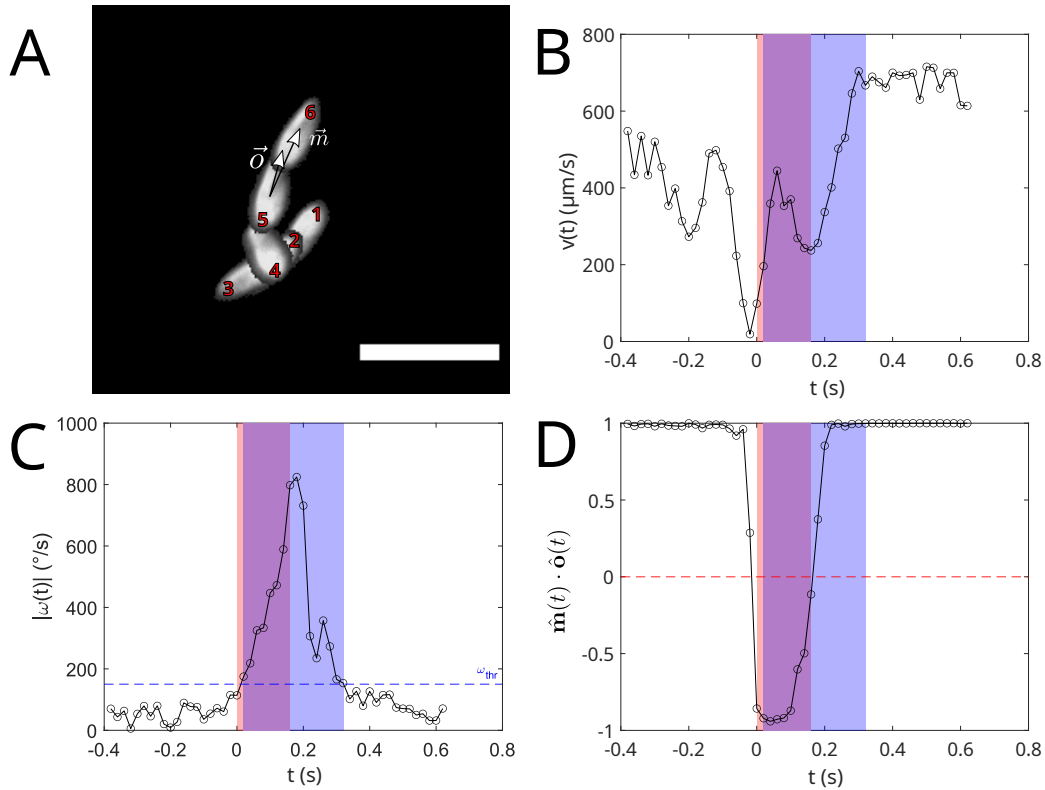


FIG. 2.9 Exemple typique d'une AR. (A) Superposition de 6 images en champ sombre d'une AR. Les images successives sont numérotées chronologiquement de 1 à 6 et espacées de 200 ms. Les flèches blanches indiquent schématiquement pour l'image n°5 la direction du vecteur mouvement \mathbf{m} et du vecteur orientation \mathbf{o} servant à la détection de la nage arrière. La barre d'échelle représente 300 μm . (B) Vitesse instantanée $v(t)$ au cours du temps. L'origine des temps $t = 0$ est prise au début de la nage arrière. Les régions colorées représentent respectivement, la phase de nage arrière pure (rose), la phase où la nage arrière et la réorientation coexistent (violet) et la phase de réorientation pure (bleue). (C) Vitesse angulaire instantanée (en norme) $|\omega(t)|$ au cours du temps. La ligne pointillée horizontale représente le seuil pour la détection de la phase de réorientation. (D) Produit scalaire entre le vecteur mouvement unitaire $\hat{\mathbf{m}}(t)$ et le vecteur orientation unitaire $\hat{\mathbf{o}}(t)$ au cours du temps. La ligne pointillée horizontale représente le seuil pour la détection de la nage arrière. Pour tous les graphes, les points de données sont séparés de 20 ms.

qui coïncide avec un minimum local de vitesse et la fin de la nage arrière : la paramécie pivote autour de sa partie postérieure tout en restant sur place. Enfin, la rotation perd en

vitesse alors que la paramécie accélère en avant (région bleue) jusqu'à atteindre à nouveau sa vitesse de nage typique.

2.2.3 Réorientations hors du plan

L'environnement dans lequel se déplacent les paramécies peut être décrit comme pseudo-2D avec une épaisseur de confinement $h = 340 \mu\text{m}$, c'est-à-dire dans lequel le mouvement privilégié est dans le plan d'observation $(0, x, y)$ (plan horizontal). Toutefois, étant donné que l'épaisseur de confinement fait environ 2 fois la longueur de la paramécie et 10 fois sa largeur, la paramécie peut quand même effectuer des mouvements 3D, comme ses trajectoires hélicoïdales typiques ou des réorientations hors du plan, selon l'axe z . Une façon simple de détecter les instants où la paramécie sort du plan (x, y) est la suivante. Lorsque la paramécie sort du plan (x, y) , son excentricité apparente diminue. Ainsi, les événements de réorientation hors du plan (HP) correspondent aux instants durant lesquels $e(t) < e_{thr} = 0.75$, où le seuil e_{thr} est choisi empiriquement. Inversement, lorsque la paramécie est dans le plan d'observation (x, y) son excentricité est maximale ainsi que son grand axe.

Quelle fraction de temps la paramécie passe-t-elle hors du plan ? En l'absence d'obstacle, la durée totale des événements HP représente $1.2 \pm 0.35\%$ du temps total d'observation T_{obs} (moyenne \pm SEM, $T_{obs} = 134 \text{ min}$, $M = 10$ expériences indépendantes). Cela confirme que les paramécies nagent principalement en 2D.

Toutefois, est-ce que cette observation est la même à l'échelle des AR ? Y a-t-il une composante 3D plus forte lors de la phase de réorientation ? Il est alors nécessaire d'effectuer une analyse plus fine du mouvement 3D. En particulier, comment obtenir les caractéristiques de sa réorientation dans le plan vertical en connaissant uniquement sa projection dans le plan horizontal d'observation ?

2.2.3.1 Idée générale

On appellera par la suite (R) le référentiel du laboratoire d'origine O et orienté selon (x, y, z) et (R') le référentiel de la paramécie (représentée par une ellipse) ayant pour origine O' le centroïde de l'ellipse et d'axe x' orienté vers l'avant de la paramécie (une seule dimension est utile ici). On notera respectivement la valeur typique, pour une trajectoire donnée, du demi-grand axe a et du demi-petit axe b lorsque son vecteur directeur est coplanaire à (x, y) (*i.e.* la paramécie nage dans le plan d'observation) : $a = a_{\parallel}$ et $b = b_{\parallel}$. Ils sont calculés comme le 95e centile des instants de la trajectoire où $e(t) > e_{thr}$ grâce à la fonction Matlab `perctile.m`. L'angle de réorientation sera appelé $\theta_{\perp}(t)$.

Pour simplifier, nous considérons ici que l'origine O' de (R') coïncide avec l'origine

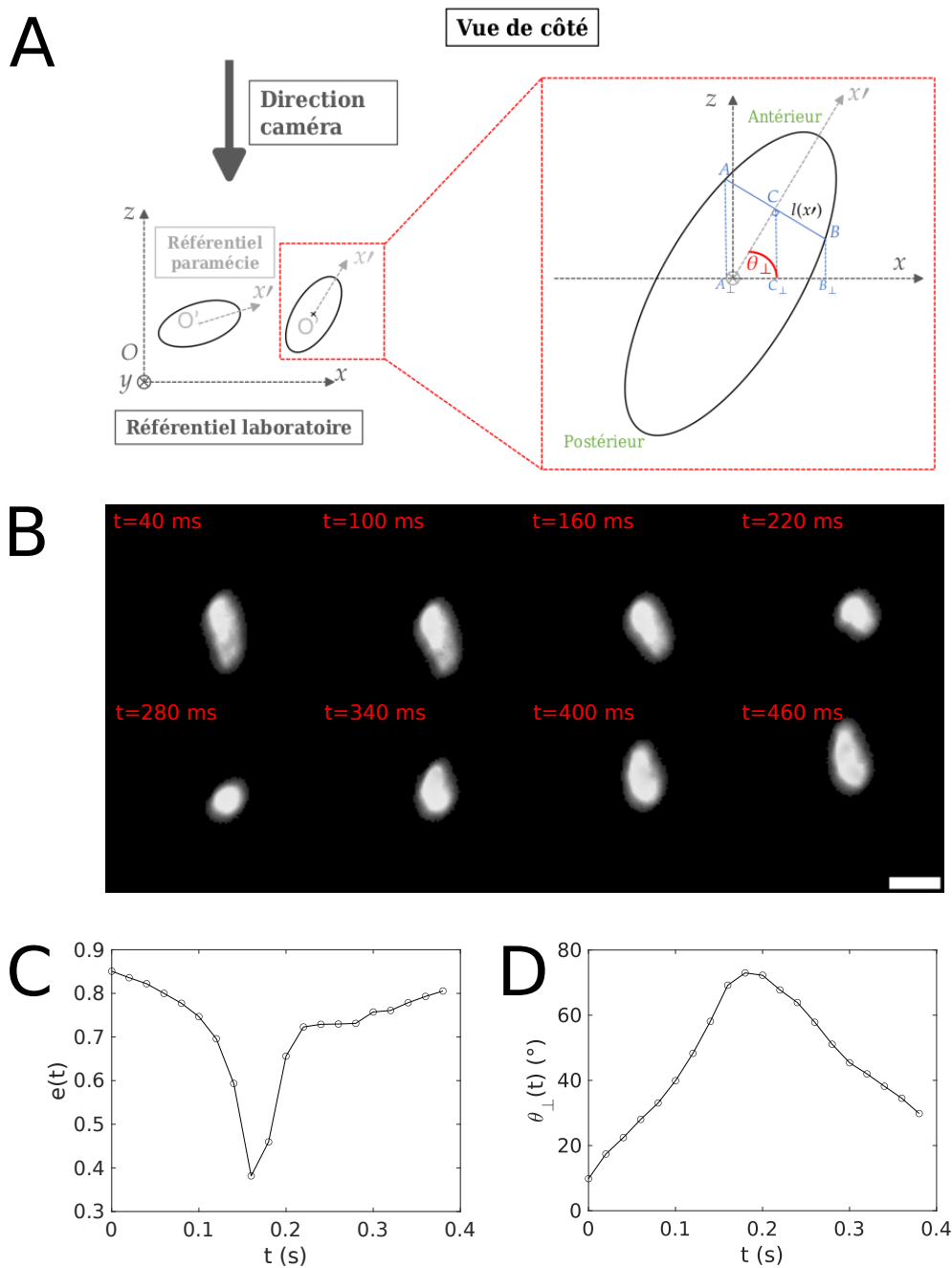


FIG. 2.10 Réorientation hors du plan. (A) Schéma en vue de côté d'une paramecie se réorientant hors du plan, et description des quantités utilisées pour l'analyse. (B) Images en champ sombre d'une paramecie effectuant une AR hors du plan. Chaque image est séparée de 60 ms de la suivante. La barre d'échelle est de 100 μm . (C) et (D) Excentricité $e(t)$ et angle de réorientation $\theta_{\perp}(t)$ en fonction du temps pour l'exemple montré en B.

O de (R) . La Fig. 2.10A représente une paramécie vue de côté (c'est-à-dire dans le plan (O, x, z)) qui fait un angle θ_{\perp} avec l'axe horizontal. On peut découper l'ellipse en plein de petits segments parallèles à son demi-petit axe, noter $[AB]$ l'un d'entre eux (centré en C) et sa projection sur le plan d'observation $[A_{\perp}B_{\perp}]$. On s'aperçoit alors que vue depuis le plan d'observation, l'ellipse aura une demi-longueur $L(\theta_{\perp})/2$ égale à la plus grande distance entre O' et B_{\perp} .

2.2.3.2 Largeur $l(x)$

Notons $l(x)$ la demi-longueur du segment situé à une distance x du centroïde de l'ellipse. Cette longueur dépend uniquement du demi-grand axe a_{\parallel} et demi-petit axe b_{\parallel} de l'ellipse ainsi que de x . Il est assez facile de montrer que pour une ellipse $l(x) = b_{\parallel} \cos(\arcsin(x/a_{\parallel})) = b_{\parallel} \sqrt{1 - (x/a_{\parallel})^2}$ pour $x \in [0, a_{\parallel}]$.

2.2.3.3 Longueur projetée $L(\theta_{\perp})$

Pour obtenir $L(\theta_{\perp})$ il suffit juste de connaître les coordonnées du point B_{\perp} sur l'axe x' en fonction des paramètres du problème.

On sait que C , l'intersection entre le segment $[AB]$ et l'axe x , est situé à une distance x de l'origine. Sa projection C_{\perp} sur l'axe x' a pour coordonnées $x \cos(\theta_{\perp})$. Or, la projection $[C_{\perp}B_{\perp}]$ du segment $[CB]$ de taille $l(x)$ sur l'axe x' est de longueur $l(x) \sin(\theta_{\perp})$. Par conséquent, le segment $[O'B_{\perp}]$ est de longueur $x \cos(\theta_{\perp}) + l(x) \sin(\theta_{\perp})$.

Enfin, on peut en déduire d'après les commentaires précédents que :

$$L(\theta_{\perp}) = 2 \max_{x \in [0, a_{\parallel}]} |x \cos(\theta_{\perp}) + l(x) \sin(\theta_{\perp})| \text{ qui se simplifie après calcul en } L(\theta_{\perp}) = 2\sqrt{a_{\parallel}^2 \cos^2(\theta_{\perp}) + b_{\parallel}^2 \sin^2(\theta_{\perp})}$$

2.2.3.4 Angle θ_{\perp}

Il reste à inverser la formule précédente pour obtenir $\theta_{\perp}(t)$ en fonction de a_{\parallel} , b_{\parallel} et $a(t)$. En remarquant que la longueur apparente de la paramécie L n'est rien d'autre que $2a$, on en déduit après simplification : $\theta_{\perp}(t) = \arccos \sqrt{\frac{a(t)^2 - b_{\parallel}^2}{a_{\parallel}^2 - b_{\parallel}^2}}$

2.2.3.5 Détection des AR hors du plan

La détection des AR hors du plan se fait de manière similaire à celles dans le plan, avec les mêmes seuils appliqués.

2.2.3.6 Conclusion

On observe en effet que $19 \pm 3.3\%$ de toutes les AR sont effectuées hors du plan, ce qui illustre le caractère tridimensionnel des AR, mis en avant par Jennings. Par la suite, les AR hors du plan seront considérées au même titre que les AR dans le plan. Enfin, cette méthode permet d'avoir accès à l'angle de réorientation dans le plan vertical assez facilement. Cependant :

1. **Mesure directe.** Il n'existe pas de moyen de vérifier directement les valeurs de θ_{\perp} . Pour cela, il est nécessaire d'effectuer une expérience en stéréoscopie où la paramécie en nage libre est imagée selon les plans horizontaux et verticaux (voir chapitre Perspectives).
2. Il n'est pas possible de distinguer $+\theta_{\perp}$ de $-\theta_{\perp}$: on ne peut pas dire si la paramécie se retourne vers le haut ou vers le bas. Ce n'est toutefois pas crucial dans le contexte de nos analyses.

2.2.4 Statistiques des AR

Comment décrire la variabilité des AR à l'échelle de la population ? Quels sont les temps typiques qui caractérisent une AR ?

Les résultats suivants correspondent à un ensemble de $N = 1165$ AR en nage libre cumulant $M = 10$ expériences indépendantes. Nous nous intéressons ici uniquement au cas bidimensionnel décrit précédemment. Ainsi, nous avons retiré des données les AR se produisant hors du plan.

La Fig. 2.11A montre un exemple d'une trajectoire de paramécie pendant une AR spontanée. Les différentes étapes de l'AR sont numérotées de 1 à 4 et les orientations successives de la paramécie sont symbolisées par des ellipses grises. Dans l'ordre : (1) interruption de la nage avant ; (2) nage arrière ; (3) réorientation ; (4) nage avant. Comme le montre la Fig. 2.11B, en moyenne la nage arrière dure 0,15 s et les durées de nage arrière à travers la population sont distribuées de manière gaussienne ($R^2 = 0.94$) avec un écart-type de 0,064 s. La nage arrière dure environ la moitié du temps de toute l'AR puisque celle-ci dure en moyenne de 0,32 s, et suit également une distribution gaussienne mais d'écart-type 0,12 s ($R^2 = 0.96$).

Comment se réoriente la paramécie durant une AR ? Notons t_{AR}^i et t_{AR}^f l'instant de début et de fin de l'AR. On définit alors l'angle de réorientation $\Delta\theta_{AR} \doteq \theta(t_{AR}^f) - \theta(t_{AR}^i)$ qu'on calcule modulo π pour $\theta(t_{AR}^i)$ et $\theta(t_{AR}^f)$ dans l'intervalle $[0, 2\pi]$. La Fig. 2.11C montre clairement que cette distribution n'est pas uniforme, ce qui est le signe d'une corrélation entre l'orientation au début et à la fin de l'AR. On en déduit que la paramécie

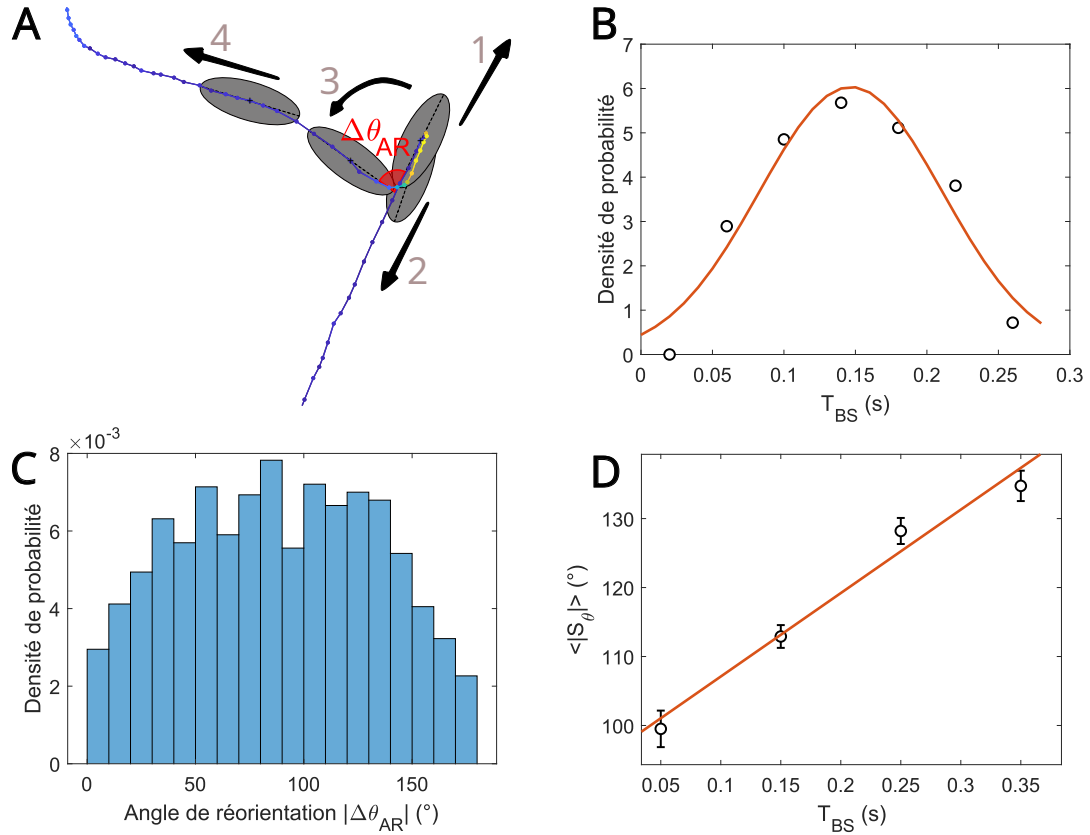


FIG. 2.11 *Statistiques des AR. (A) Schéma d'une AR spontanée avec la trajectoire réelle superposée. La code couleur représente l'évolution temporelle. Les points sont séparés de 20 ms. Les différentes étapes de l'AR sont numérotées. L'angle de réorientation est marqué en rouge. (B) Densité de probabilité de la durée de nage arrière. Les bins sont de largeur 40 ms. La courbe rouge est un ajustement gaussien de moyenne $\mu_{BS} = 0,15 \pm 0,014$ s et écart-type $\sigma_{BS} = 0,064 \pm 0,018$ s (intervalle de confiance à 95 %), avec $R^2 = 0,94$. (C) Densité de probabilité de la valeur absolue de l'angle de réorientation $\Delta\theta_{AR}$, défini comme la différence entre l'orientation de la paramécie à la fin de l'AR et l'orientation au début de l'AR, modulo π . La largeur d'un bin est de 10° . (D) Moyenne du déplacement angulaire total en valeur absolue, en fonction de la durée de nage arrière. La courbe rouge est un ajustement affine de coefficient directeur 121 ± 57 °/s et d'ordonnée à l'origine 95 ± 13 ° avec $R^2 = 0,98$. La largeur d'un bin est de 100 ms.*

se réoriente en moyenne d'environ 90° au cours d'une AR. De plus, il existe un lien entre durée de nage arrière T_{BS} et déplacement angulaire absolu, défini comme la somme des déplacements angulaires instantanés $d\theta(t) = \theta(t + \Delta t) - \theta(t)$, durant toute la nage arrière. La Fig. 2.11D montre une corrélation linéaire entre les deux quantités, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,98$. Plus la nage arrière est longue, plus l'amplitude de la réorientation sera importante. Cela se comprend à travers le caractère non purement translationnel de la nage arrière. Comme montré en Fig. 2.9C (régions rose et violette), celle-ci est principalement à vitesse angulaire non nulle, la paramécie recule tout en se réorientant, ce qui contribue à augmenter le déplacement angulaire total.

Enfin, il est possible de calculer une fréquence d'AR définie comme le rapport entre le nombre total d'AR sur toute l'expérience divisé par le temps d'observation total, $f_{AR} = \frac{\#AR}{T_{obs}} = 0,16 \pm 0,015$ Hz (moyenne et SEM sur $M = 10$ expériences indépendantes). Celle-ci vaut $0,14 \pm 0,012$ Hz lorsque les réorientations hors du plan sont retirées.

2.3 Statistiques d'une trajectoire typique

Les exemples de trajectoires typiques en nage libre, montrées en Fig. 2.12A, permettent de mettre en évidence comment les paramécies parcourent l'espace. A l'échelle d'une trajectoire, comme sur l'exemple en Fig. 2.12B, son mouvement se décompose en une nage hélicoïdale interrompue par des changements de direction. Ce mouvement hélicoïdal est produit par le battement coordonné de milliers de cils qui couvrent sa surface membranaire et se décrit comme un mouvement vers l'avant avec une rotation autour de l'axe longitudinal, comme une hélice gauche. D'après Jennings, le sillon oral de la paramécie fait face au centre de l'hélice. La description de cette nage hélicoïdale est faite en section 2.5. La Fig. 2.12C montre une portion de trajectoire hélicoïdale d'une durée de 2 s et qui effectue un cycle de rotation en environ 1,3 s. Les changements de direction, quant à eux, sont des AR comme décrit en section 2.2 qui se produisent spontanément. Les AR détectées sont marquées d'un cercle rouge sur la Fig. 2.12B. Les changements de direction visibles mais non marqués sont des AR non prises en compte par l'algorithme de détection, pour les raisons expliquées dans la section précédente. Par exemple, pour la première AR non détectée, la vitesse pendant la nage arrière est trop faible : $v(\bar{t}) = 56 < v_{thr} = 100$ $\mu\text{m/s}$, et se fait rejeter par le filtre des paramécies immobiles. Pour la deuxième, la vitesse de rotation pendant la phase de réorientation est en dessous du seuil ω_{thr} . Pour cette trajectoire, le taux d'AR non détectées est de 18 % (2 sur 11 AR). Les profils de vitesses au cours du temps en Fig. 2.12D et F montrent que les AR se caractérisent par une baisse de la vitesse de nage en norme $v(t)$ et une augmentation de la vitesse angulaire en norme $|\omega(t)|$ comme expliqué précédemment. Entre ces évènements

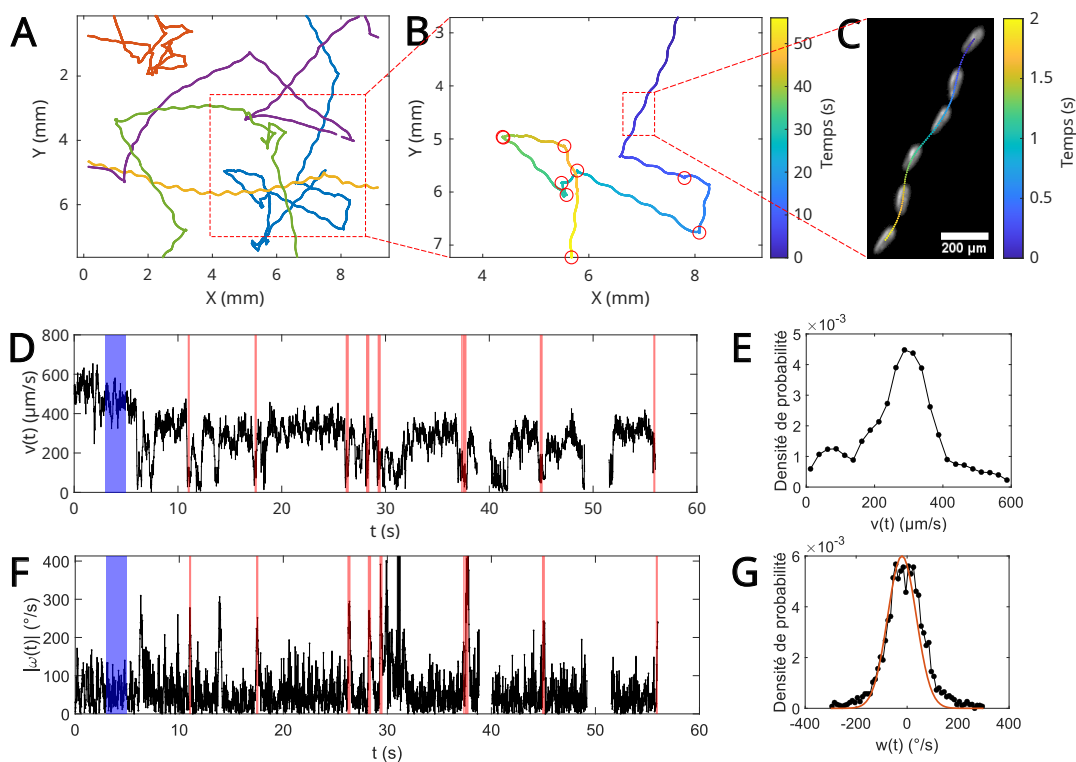


FIG. 2.12 *Statistiques d'une trajectoire typique en nage libre. (A) Trajectoires typiques 2D de 5 paramécies en nage libre. (B) Zoom sur une trajectoire. On y distingue les mouvements hélicoïdaux interrompus par des AR. Le code couleur indique le temps en secondes. La durée totale est de 56 s. Les AR détectées par l'algorithme sont marquées d'un cercle rouge. (C) Zoom sur une portion de la trajectoire, de durée 2 s montrant le mouvement hélicoïdal de la paramécie. (D) Vitesse instantanée au cours du temps pour la trajectoire montrée en (B). La portion de trajectoire montrée en (C) est mise en valeur par la région bleue. Les régions rouges marquent temporellement les AR détectées. Les données manquantes autour de $t = 40$ s et $t = 50$ s ont été retirées par difficulté d'analyse. (E) Densité de probabilité de vitesses instantanées pour la même trajectoire. La largeur d'un bin est de $25 \mu\text{m/s}$ (F) Vitesse angulaire instantanée (en norme) au cours du temps. (G) Densité de probabilité des vitesses angulaires instantanées. La largeur d'un bin est de $10^\circ/\text{s}$. La courbe rouge est un ajustement avec une loi gaussienne de moyenne $-20^\circ/\text{s}$ et déviation standard $56^\circ/\text{s}$ ($R^2 = 0.92$).*

de réorientation, la vitesse linéaire instantanée $v(t)$ vaut en moyenne $300 \mu\text{m/s}$ et présente des fluctuations d'amplitude $100 \mu\text{m/s}$ sur quelques secondes. Cette analyse se retrouve sur la densité de probabilité des vitesses instantanées donnée en Fig. 2.12E et qui présente un pic indiquant la vitesse typique pendant la nage, autour de $300 \mu\text{m/s}$, et une queue qui correspond aux événements de réorientations. La vitesse angulaire instantanée $\omega(t)$ suit une loi gaussienne de moyenne $-20 \text{ }^\circ/\text{s}$ et d'écart-type $56 \text{ }^\circ/\text{s}$ ($R^2 = 0.92$), indiquée par la courbe rouge de la Fig. 2.12G. En norme, la vitesse angulaire est de $87 \text{ }^\circ/\text{s}$. Les données manquantes en Fig. 2.12D et F ont été retirées par certains filtres d'analyse.

2.4 Mouvement brownien

Nous avons vu qu'à l'échelle d'une trajectoire typique, les vitesses instantanées fluctuaient assez largement, principalement en raison des réorientations spontanées dont la signature est un pic à basse vitesse dans la distribution des vitesses instantanées (Fig. 2.12E). Hormis la contribution due à ces événements là, les vitesses fluctuent avec une amplitude de $100 \mu\text{m/s}$ autour d'une valeur moyenne plutôt bien définie. Il est alors raisonnable de caractériser une paramécie par une vitesse typique ou vitesse moyenne. Comment sont distribuées ces vitesses moyennes à l'échelle de la population ?

Pour chaque trajectoire de paramécie en nage libre, nous avons calculé sa vitesse moyenne \bar{v} , qui correspond à la moyenne temporelle des vitesses instantanées tout au long de la trajectoire. La densité de probabilité de ces vitesses moyennes est montrée en Fig. 2.13A et correspond à $N = 1205$ trajectoires de paramécies en nage libre de $M = 18$ expériences indépendantes pour un temps d'observation total de $T_{obs} = 265 \text{ min}$. Cette distribution ressemble moins à une gaussienne qu'à une loi de Maxwell-Boltzmann qui décrit la vitesse de particules d'un système à l'équilibre et dont la densité de probabilité est donnée par :

$$p(v) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{v^2}{v_p^3} e^{-2v^2/v_p^2} \quad (2.7)$$

Un ajustement par cette loi de la densité de probabilité expérimentale (courbe rouge en Fig. 2.13A) montre un bon coefficient de détermination $R^2 = 0.95$ et permet d'obtenir une vitesse caractéristique $v_p = 806 \pm 40 \mu\text{m/s}$ (intervalles de confiance à 95%). L'ajustement est calculé avec la méthode des moindres carrés non-linéaire, initialisée à $v = 600 \mu\text{m/s}$ et entre les bornes 0 et $2000 \mu\text{m/s}$. En calculant sur toute la population la moyenne et l'écart-type des vitesses moyennes par trajectoire, on obtient $\langle \bar{v} \rangle = 685 \pm 316 \mu\text{m/s}$, ce qui est cohérent avec la vitesse caractéristique calculée précédemment avec le modèle Maxwell-Boltzmann. Cet accord entre notre distribution expérimentale des vitesses et une loi de Maxwell-Boltzmann est surprenante, puisque dans notre cas, le système est

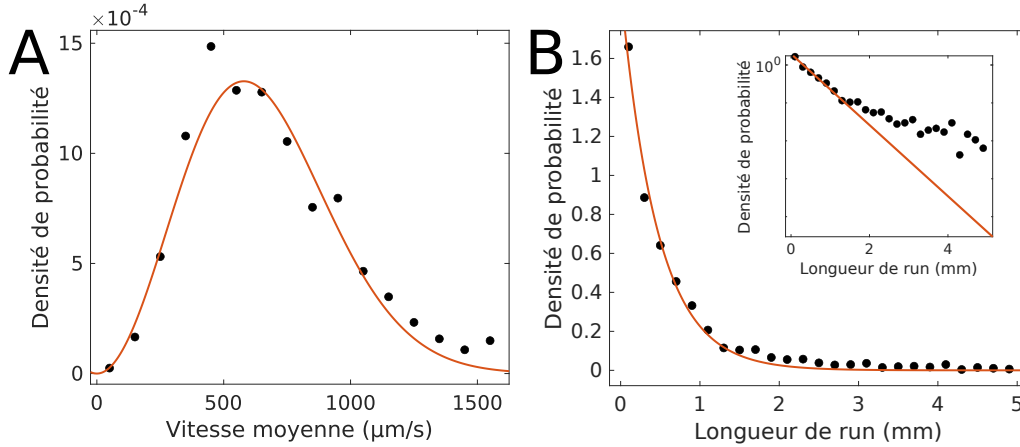


FIG. 2.13 (A) Densité de probabilité des vitesses moyennes par trajectoire pour $N = 1205$ trajectoires en nage libre provenant de $M = 18$ expériences indépendantes. La largeur d'un bin est de $100 \mu\text{m/s}$. La courbe rouge est un ajustement par une loi de Maxwell-Boltzmann (Eq. 2.7) avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.95$ et qui permet d'extraire une vitesse caractéristique $v_p = 806 \pm 40 \mu\text{m/s}$ (intervalles de confiance à 95%). (B) Densité de probabilité des longueurs de runs pour $N = 416$ trajectoires en nage libre provenant de $M = 18$ expériences indépendantes. La largeur d'un bin est de 0.2 mm . La courbe rouge est un ajustement par une loi exponentielle (Eq. 2.8) au coefficient de détermination $R^2 = 0.99$ qui permet d'extraire une longueur caractéristique $l_p = 0.46 \pm 0.02 \text{ mm}$ (intervalles de confiance à 95%). Encart : Même distribution et ajustement, mais en échelle semi-log. On observe une tendance linéaire pour les longueurs de runs inférieures à 2 mm .

hors-d'équilibre. Nous n'avons toutefois pas poursuivi les analyses de ce côté là.

En réalité, le comportement de la paramécie présente des similarités avec le comportement run-and-tumble des bactéries décrit par Howard Berg [83]. A l'échelle macroscopique, les trajectoires de *Escherichia coli* ressemblent à celles de *Paramecium*, avec des "runs" hélicoïdaux en quasi ligne droite interrompus par des "tumbles" pendant lesquels la paramécie se réoriente aléatoirement. À noter que, comme chez la bactérie *Escherichia coli* [84], la paramécie est soumise à un phénomène de diffusion rotationnelle : entre deux changements de direction, la paramécie ne nage pas en ligne droite mais dérive légèrement dans une direction. Si l'on note t_i le début du run, défini comme la fin d'une AR, et t_f la fin du run, défini comme le début de l'AR suivante, alors la longueur du run est donnée par $l = \sqrt{(x(t_f) - x(t_i))^2 + (y(t_f) - y(t_i))^2}$ où (x, y) est la position du centroïde de la paramécie. La Fig. 2.13B montre la densité de probabilité expérimentale des longueurs

de runs pour des paramécies nageant dans un environnement sans obstacle. Les données comprennent $N = 416$ trajectoires composées d'au moins 2 AR minimum (nécessaire pour définir un run), sur $M = 18$ expériences indépendantes, ce qui donne un total de 2347 runs. Comme le montre la courbe rouge en Fig. 2.13B, la longueur l d'un run peut être modélisée par une loi exponentielle :

$$p(l) = ce^{-l/l_p} \quad (2.8)$$

avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0.99$. Ce résultat fait écho à celui d'Howard Berg pour *Escherichia coli* [85]. Il est également possible d'extraire une longueur de run typique $l_p = 0.46 \pm 0.02$ mm (intervalles de confiance à 95%). Toutefois, observer en échelle semi-logarithmique cette même densité de probabilité (encart de la Fig. 2.13B) révèle que la queue de la distribution dévie d'une loi exponentielle qui décrit essentiellement le comportement à temps court. En effet, en effectuant directement un ajustement linéaire du logarithme de la distribution, on obtient cette fois-ci un coefficient $R^2 = 0.91$ avec une longueur caractéristique $l_p = 0.99 \pm 0.15$ mm.

Un processus de run-and-tumble en nage libre est une marche aléatoire dont les pas sont distribués de manière exponentielle, en supposant une vitesse constante pendant les runs qui ont dans notre cas une longueur typique de $l_p = 0.46$ mm. Avec un grand nombre de pas, le théorème central limite montre une convergence vers une distribution gaussienne, c'est-à-dire un mouvement brownien [86, 87]. Une autre façon de le voir est de calculer le déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement*, MSD) défini comme :

$$MSD(\Delta t) = \langle (r(t + \Delta t) - r(t))^2 \rangle \quad (2.9)$$

où $r(t) = \sqrt{x^2(t) + y^2(t)}$ est la distance entre l'origine et la position $(x(t), y(t))$ du centroïde de la paramécie à l'instant t , Δt est le pas de temps et $\langle \rangle$ symbolise une moyenne sur la population. Il est connu [88] qu'en 2 dimensions,

$$MSD(\Delta t) = \begin{cases} v_p^2 \Delta t^2 & \Delta t \rightarrow 0 \\ 4D\Delta t & \Delta t \rightarrow \infty \end{cases} \quad (2.10)$$

où v_p est la vitesse caractéristique pendant le régime balistique (à temps court) et D est le coefficient de diffusion qui caractérise l'exploration spatiale d'une particule brownienne.

Pour obtenir expérimentalement le MSD, il n'est pas nécessaire de résoudre optiquement la forme asymétrique de la paramécie - seulement la position (x, y) du centroïde est nécessaire - mais plutôt d'avoir accès à son comportement à temps long. Pour cela, nous avons cette fois-ci utilisé les données en nage libre à grand champ dans lesquelles la fréquence d'acquisition est $f_\alpha = 35$ Hz et la taille de la fenêtre est de 2448×2048 pixels

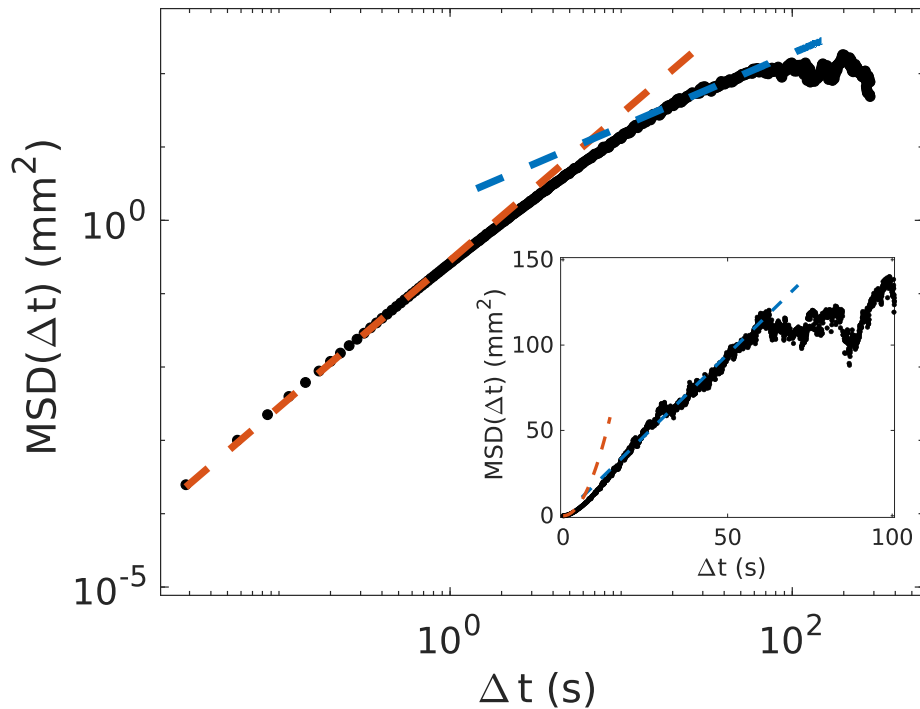


FIG. 2.14 Déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du pas de temps Δt en échelle logarithmique pour $N = 68$ trajectoires durant plus d'une minute chacune. Les lignes pointillées rouges et bleue correspondent respectivement à un ajustement des régimes balistique et diffusif par une fonction carrée ($\Delta t \in [0, 1]$ s, $R^2 = 0.99$) et par une fonction affine ($\Delta t \in [20, 55]$ s, $R^2 = 0.97$). L'encart présente la même figure mais en échelle linéaire.

ou 23.0×19.2 mm. Ensuite, les trajectoires faisant moins de 2000 images sont rejetées ainsi que celles présentant un comportement anormal (*e.g.* mouvements circulaires), après inspection visuelle de chaque trajectoire. Sur un total de $M = 10$ expériences indépendantes, il en résulte 68 trajectoires de paramécies. La Fig. 2.14 montre la courbe du MSD expérimental en échelle logarithmique. Celle-ci est bien ajustée par une fonction carrée à temps court ($\Delta t \in [0, 1]$ s, $R^2 = 0.99$, ligne rouge pointillée) et par une droite à temps long ($\Delta t \in [20, 55]$ s, $R^2 = 0.97$, ligne bleue pointillée). Le comportement de la paramécie peut donc bien être modélisée par un régime balistique à temps court et un régime diffusif à temps long. A temps court, la paramécie nage en ligne droit donc son déplacement moyen est proportionnel au temps, mais à temps long, avec les réactions d'évitement spontanées, son comportement ressemble à celui d'une marche aléatoire. De plus, du régime balistique (temps court), on peut extraire une vitesse caractéristique $v_p = 0.53 \pm 0.005$ mm/s

- consistante avec celles précédemment extraites - et du régime diffusif, un coefficient de diffusion $D = 0.473 \pm 0.0013 \text{ mm}^2/\text{s}$. Nous nous heurtons toutefois aux limites de notre système expérimental et en particulier à la taille de notre fenêtre spatiale. Dans le cas où une paramécie traverserait le champ d'observation sur sa partie la plus large (en diagonale), cela correspondrait à un déplacement total d'environ 30 mm, soit $MSD \sim 10^2 \text{ mm}^2$. C'est en effet autour de cette valeur qu'un plateau est observé sur la courbe du MSD. Cela a pour conséquence de limiter la fenêtre temporelle d'observation du régime diffusif dont nous capturons seulement le début. Cela limite la profondeur et la finesse des analyses de diffusivité et l'observation éventuelle d'autres régimes. Pour cela, il faudrait réaliser des expériences à plus grand champ. C'est ce que nous avons tenté, mais cela a été compliqué par la présence de trajectoires circulaires. Une autre possibilité est le développement du suivi automatisé qui permet de suivre des paramécies à très long temps et longue distance et dont nous reparlerons au chapitre 5.

2.5 Modélisation électrophysiologique et cinématique

Cette section présente les résultats de notre article [56], disponible en suivant le lien <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.15.480485v3.abstract>. Cet article consiste à proposer un modèle empirique du potentiel d'action de la paramécie à partir d'expériences d'électrophysiologie réalisées sur des paramécies vivantes immobilisées grâce à un dispositif d'aspiration conçu au Laboratoire Jean Perrin et à l'Institut de la Vision [58], le tout couplé à des mesures du battement des cils grâce à des méthodes de Vélocimétrie par Image de Particules (PIV). S'ajoutent à cela des mesures comportementales de la nage des paramécies réalisées au LJP, le tout permettant une modélisation de la nage des paramécies qui prend en compte le battement des cils.

Ma contribution dans cette article repose principalement sur l'analyse comportementale de la paramécie en nage libre, grâce aux expériences décrites dans le présent chapitre. Cela a permis d'une part, une description de la nage hélicoïdale sur $N = 20$ trajectoires et une durée de 121 s permettant une estimation de la période, de la vitesse et de l'amplitude de rotation. D'autre part, le grand volume statistique des expériences comportementales en piscine a permis de montrer un lien statistique entre la durée de la nage arrière et l'amplitude de la réorientation.

Chapitre 3

Comportement en milieu encombré

Contents

3.1	Matériels et méthodes	55
3.2	Interactions passives	66
3.3	L'OTAR, signature de la mécanosensibilité	77
3.4	Influence de la vitesse de nage sur les OTAR	89
3.5	Influence du rayon de courbure sur les OTAR	90
3.6	Corrélations temporelles	94

3.1 Matériels et méthodes

Le montage expérimental pour l'étude du comportement des paramécies en milieu encombré est identique à celui utilisé pour la nage libre présenté en section 2.1.3, excepté pour les piscines qui comportent désormais des obstacles (Fig. 3.1) dont la conception est décrite dans la section 3.1.1. La préparation des cultures, l'acquisition des films, les méthodes d'analyse sont les mêmes. À ces dernières s'ajoutent la détection des piliers et l'analyse des interactions entre paramécies et piliers.

3.1.1 Conception des piscines à obstacles

Les environnements pseudo-2D (dits "piscines") sont en PolyDiMethylSiloxane (PDMS) et consistent en une enceinte carrée délimitée par des murs de hauteur $h = 340 \mu\text{m}$ et de côté 30 mm. Le fond de la piscine est décoré de piliers de hauteur $h = 340 \mu\text{m}$ et de rayon $r_p = 142,5 \mu\text{m}$. Le rayon des piliers a été varié de $r_p = 62,5 \mu\text{m}$, $r_p = 254,0$

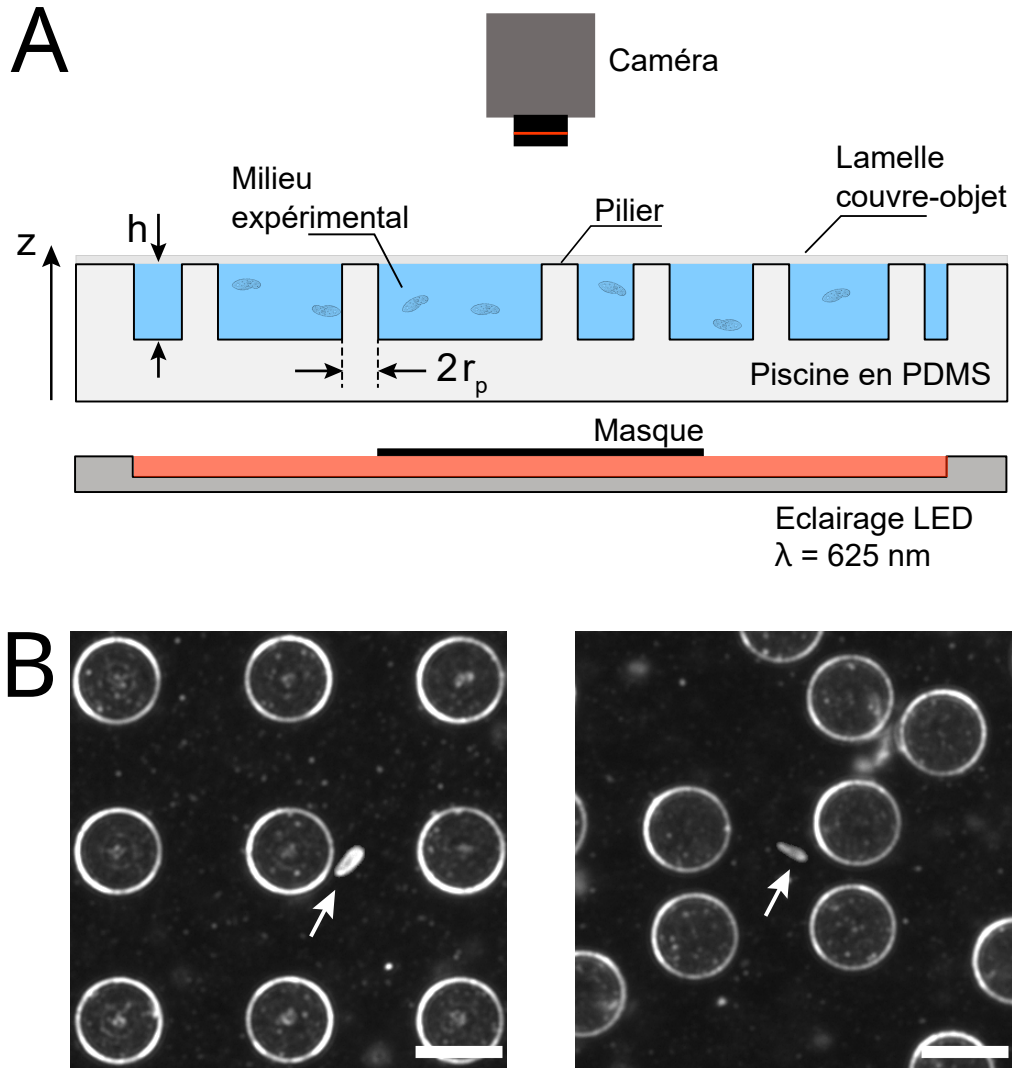


FIG. 3.1 (A) Schéma du montage expérimental dans un environnement avec obstacles (vue de côté). Le montage est identique à celui en nage libre, présenté en section 2.1.3. (B) Images en champ sombre de paramécies (identifiées avec une flèche blanche) nageant dans une piscine à obstacles répartis en réseau carré (gauche, fraction de surface $\phi = 0.20$) ou de manière aléatoire (droite, $\Phi = 0.083$). La barre d'échelle est longue de $300 \mu\text{m}$.

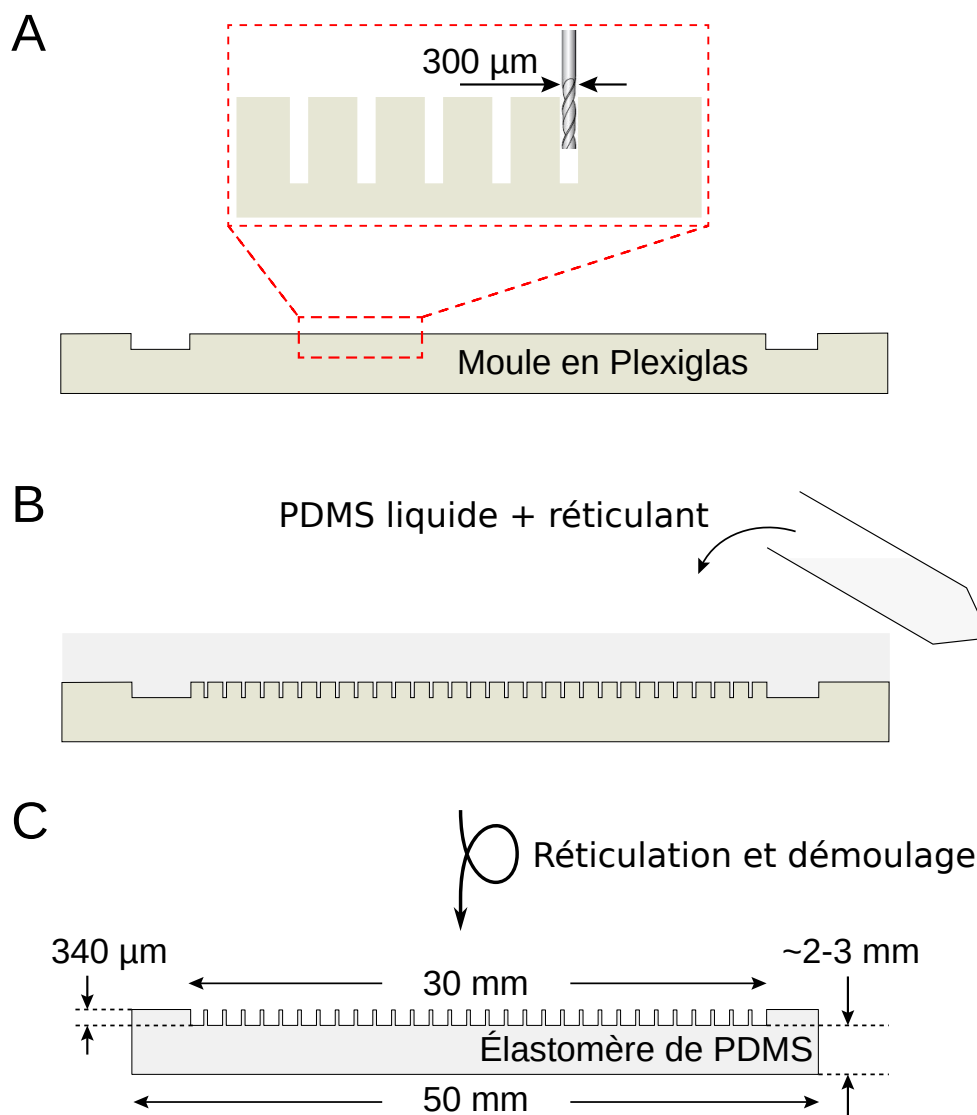


FIG. 3.2 Schéma des différentes étapes de la fabrication des piscines en PDMS. (A) Micro-usinage du moule en Plexiglas. Encart : micro-usinage des puits cylindriques. (B) Application du mélange PDMS/réticulant au ratio 10 :1 sur le moule en Plexiglas déposé dans une boîte de Pétri. (C) Démoulage de la piscine en élastomère de PDMS après 6 à 12h de réticulation dans une étuve à environ $65\ ^\circ\text{C}$.

μm et $r_p = 987,5 \mu\text{m}$ pour des expériences spécifiques.¹ Leur conception résulte d'une combinaison de techniques de micro-usinage et de moulage comme représenté sur la Fig. 3.2.

Les opérations de micro-fraisage et de micro-forage sont réalisées grâce à une machine-outil à commande numérique (Minitech, Machinery Corp., USA) dont les instructions sont fournies en langage GCode. Un moule carré en poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) ou Plexiglas (nom commercial), de côté 50 mm et d'épaisseur 5 mm est tout d'abord creusé avec une fraise à bout carré et de diamètre 1 mm (MX230 MUGEN-COATING 2-Flute LEAD30 End Mill, diamètre $D = 1 \text{ mm}$, longueur de coupe $L = 2 \text{ mm}$, NS TOOL, Japon) pour former une tranchée carrée de profondeur $h = 340 \mu\text{m}$. Ensuite, des puits cylindriques de profondeur $h = 340 \mu\text{m}$ et de rayon r_p sont forés dans le volume délimité par la tranchée. Puisque le foret (KT-R Extended Length Drill, $D = 304.8 \mu\text{m}$, $L = 7.112 \text{ mm}$, PMT, USA) possède un bout conique, les 50 derniers micromètres du puit sont creusés avec une fraise à bout plat de même rayon (TS-S Standard Length Mill, $D = 304.8 \mu\text{m}$, $L = 0.914 \text{ mm}$, PMT, USA), afin d'assurer une bonne adhésion entre les piliers et la lamelle couvre-objet et d'éviter que les paramécies ne viennent s'y piéger. Les Fig. 3.3A et B montrent respectivement un pilier en PDMS conçu uniquement avec le foret et un pilier en PDMS conçu avec la combinaison du foret et de la fraise. Dans le second cas, le sommet du pilier est conique tandis qu'il est plat dans le premier cas. Dans le premier cas, on remarque une légère discontinuité de quelques microns d'épaisseur aux $2/3$ de la hauteur du pilier qui est due à une différence de diamètre entre les deux outils, dont la tolérance est de $\pm 12.5 \mu\text{m}$ selon PMT tools. Les puits sont distribués avec une résolution spatiale de $1 \mu\text{m}$, soit selon un réseau carré, soit aléatoirement. Dans le cas du réseau carré, le paramètre de maille s est varié de $500 \mu\text{m}$ à $900 \mu\text{m}$, ce qui donne une fraction de surface $\Phi = \pi r_p^2 / s^2$ allant de 0.28 à 0.083. Les réseaux aléatoires sont construits en gardant Φ constant par rapport au réseau carré équivalent en fixant le nombre de piliers à distribuer et la surface de la piscine. Une distance entre les bords des puits d'au moins $60 \mu\text{m}$ est imposée pour éviter le piégeage des paramécies.

Les piscines sont fabriquées avec un élastomère transparent commercial, le PDMS (Sylgard 184 Dow Corning, USA). Un mélange de 40 mL de PDMS/réticulant au ratio 10 : 1 est d'abord centrifugé à 3000 g pendant environ 5 min, puis le moule est placé dans un boîte de Pétri. Le mélange est ensuite versé sur le moule et laissé pendant une heure dans une chambre à vide pour éliminer les bulles d'air. Enfin, l'ensemble est mis à réticuler dans un four à $65 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 6 à 12h. La piscine est ensuite découpée au scalpel et décollée précautionneusement du moule.

1. Dans la plupart des expériences et en l'absence de mention contraire, le rayon des piliers est fixé à $r_p = 142,5 \mu\text{m}$.

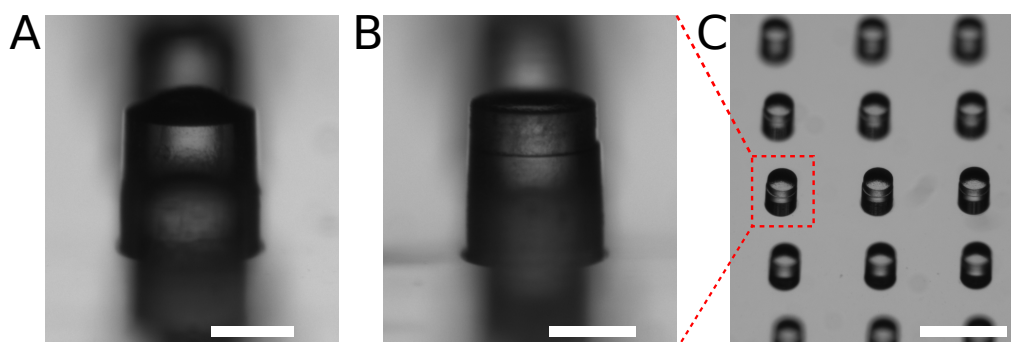


FIG. 3.3 Images en microscopie à champ sombre de piliers en PDMS. (A) Pilier de rayon $r_p = 142.5 \mu\text{m}$ usiné uniquement avec un foret. La barre d'échelle est de $100 \mu\text{m}$. (B) Pilier de rayon $r_p = 142.5 \mu\text{m}$ usiné avec la combinaison d'un foret et d'une fraise. La barre d'échelle est de $100 \mu\text{m}$. (C) Réseau carré de piliers à paramètre de maille $s = 500 \mu\text{m}$ ($\Phi = 0.28$). La barre d'échelle vaut $400 \mu\text{m}$.

3.1.2 Détection des piliers

Le centre et le rayon des piliers sont détectés sur l'arrière-plan généré à partir des premières images de chaque film (section 2.1.4) grâce à un programme MATLAB personnalisé. Pour chaque film, l'arrière-plan est filtré avec un filtre gaussien de déviation standard 1 pixel pour éliminer le bruit haute fréquence. Un seuil est ensuite calculé avec la méthode d'Otsu [89] qui consiste à trouver le minimum de la variance intra-classe de tous les seuillages possibles. Ce seuil, multiplié par un coefficient c choisi à la main après essais et inspections visuelles, et valant en général $c = 1.7$ permet de définir le seuil pour la binarisation de l'image. A partir de cette image, les piliers sont détectés grâce au programme MATLAB natif `imfindcircles.m` qui utilise la méthode de la transformée de Hough pour la détection de cercles sur des images imparfaites [90] [91]. Il prend en entrée l'image binarisée et un intervalle de tolérance sur le rayon de piliers défini comme le rayon de l'outil $D/2 \simeq 152 \mu\text{m}$ plus ou moins 2 pixels, soit $7.6 \mu\text{m}$. Une boucle sur le coefficient c dont la valeur initiale est $c = 1.7$ est appliquée et affiche à chaque itération l'image arrière-plan originale avec le contour des piliers détectés. Le coefficient c est varié jusqu'à sa valeur optimale, lorsque tous les piliers de l'image ont été détectés. En sortie est fourni un tableau contenant pour chaque pilier détecté, la position (x_p, y_p) de son centre et son rayon. Les valeurs obtenues pour le rayon des piliers avec cette méthode n'ont en revanche pas été utilisées dans l'analyse car un effet de diffraction fait apparaître un halo blanc autour du pilier, sur-estimant sa taille, comme le montre la Fig. 3.1B. Nous avons donc préféré une mesure du rayon plus directe à l'aide d'un microscope en éclairage à champ clair. Cette mesure réalisée sur quelques piliers donne en moyenne $r_p = 142.5$

μm et fixe la valeur du rayon pour tous les piliers détectés. Nous verrons plus tard une seconde méthode qui confirmera cette mesure.

3.1.3 Détection des interactions paramécies-piliers

3.1.3.1 Couronne d'interaction

Comment les paramécies interagissent-elles avec les piliers ? Pour quantifier ces interactions, nous avons suivi la même approche que Kantsler *et al.* [92] et Contino *et al.* [93] en étudiant comment la paramécie interagit avec le pilier selon son angle d'incidence avec l'obstacle, en l'absence d'AR. Pour cela, nous définissons une couronne d'interaction comme la région annulaire $r_p < r < r_{int}$ où $r_{int} = 256 \mu\text{m}$ et centrée sur le pilier. Comme nous le verrons plus tard, le choix de r_{int} est relativement arbitraire puisqu'un choix différent modifie certaines constantes géométriques, mais sans changer le résultat. Dans le cas de Contino *et al.*, le rayon d'interaction est choisi comme le plus petit rayon qui capture intégralement l'interaction avec le pilier. Chez ces auteurs, l'organisme étudié est *Chlamydomonas reinhardtii*, dont la longueur typique avec flagelles est de $22,6 \mu\text{m}$. La micro-algue interagit avec des piliers cylindriques de $12,5 \mu\text{m}$ de rayon et un rayon d'interaction de $27 \mu\text{m}$, ce qui donne un anneau d'une épaisseur d'environ 64 % de la longueur de *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans notre cas, en prenant en compte une longueur d'environ $10 \mu\text{m}$ pour les cils, la longueur typique de *Paramecium tetraurelia* est d'environ $157 \mu\text{m}$, et l'épaisseur de l'anneau est d'environ 72% celle de la paramécie, une valeur proche de celle choisie par Contino *et al.*

Ainsi, les événements d'interaction correspondent aux instants où le centre d'une paramécie est dans la couronne d'interaction, autrement dit, lorsque la distance centre à centre $r = \sqrt{(x_e - x_p)^2 + (y_e - y_p)^2} < r_{int}$, où (x_e, y_e) sont les coordonnées du centre de l'ellipse ajustée sur la paramécie et (x_p, y_p) sont les coordonnées du centre du pilier. Cette configuration est schématisée sur la Fig. 3.4A.

3.1.3.2 Angle d'incidence

On peut définir à chaque instant de l'interaction un angle d'incidence θ_{in} , comme l'angle entre la direction radiale au pilier et l'orientation de l'ellipse, dépendant (de manière équivalente) du temps t ou de la distance r , comme schématisé sur la Fig. 3.4B. On notera θ_i (*resp.* θ_o) l'angle d'incidence θ_{in} à l'instant t_i (*resp.* t_o) où le centroïde de la paramécie entre (*resp.* quitte) la couronne d'interaction :

$$\begin{cases} \theta_i \doteq \theta_{in}(t_i) \\ \theta_o \doteq \theta_{in}(t_o) \end{cases} \quad (3.1)$$

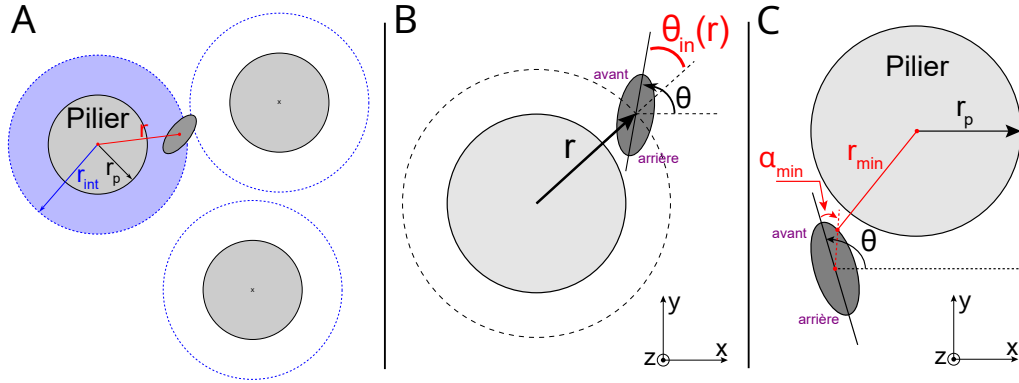


FIG. 3.4 Description des principales quantités pour l'analyse des interactions paramécie-pilier. (A) Schéma des quantités géométriques pour l'analyse à l'échelle locale du pilier. Les piliers sont schématisés par un disque gris clair et la paramécie par une ellipse gris foncé. Il y a interaction avec un pilier si le centroïde de l'ellipse est située à une distance $r < r_{int}$ du centre d'un pilier. La couronne bleue définit la région d'interaction. (B) Paramètres géométriques utilisés pour définir l'angle d'incidence. (C) Paramètres géométriques utilisés pour l'analyse fine dans la couronne d'interaction.

3.1.3.3 Discrétisation de l'ellipse

S'il y a interaction, alors une analyse plus poussée s'impose et différentes quantités sont calculées. Pour cela, le contour de l'ellipse est discrétisé pour permettre de calculer numériquement la distance entre son bord et le centre du pilier.

En coordonnées polaires, dans le cas d'une ellipse inclinée d'un angle θ avec l'axe horizontal et lorsque le centroïde de l'ellipse coïncide avec l'origine du repère, l'équation polaire de l'ellipse est donnée par :

$$\rho(\alpha) = \frac{ab}{\sqrt{a^2 \sin^2(\alpha - \theta) + b^2 \cos^2(\alpha - \theta)}} \quad (3.2)$$

où a et b sont respectivement le demi-grand axe et le demi-petit axe de l'ellipse, θ l'orientation de l'ellipse, soit l'angle entre son grand axe et l'horizontale et $\rho(\alpha)$ est la distance entre le centre de l'ellipse, et un point de l'ellipse situé à un angle α de l'axe horizontal. En coordonnées cartésiennes et dans le cas où le centre de l'ellipse n'est plus l'origine du repère mais a pour coordonnées (x_e, y_e) , l'équation de l'ellipse est donnée par :

$$\begin{cases} x(\alpha) = \rho(\alpha) \cos(\alpha) + x_e \\ y(\alpha) = \rho(\alpha) \sin(\alpha) + y_e \end{cases} \quad (3.3)$$

La discrétisation est calculée sur un ensemble de $N = 1000$ points de données pour α , uniformément répartis sur $[0, 2\pi]$, qui permettent de générer autant de couples $(x(\alpha), y(\alpha))$ pour les coordonnées du contour de l'ellipse. Il est alors possible de définir $\alpha_{min} = \theta - \tilde{\alpha}$ où $\tilde{\alpha}$ correspond à l'angle α qui minimise la distance $\sqrt{(x(\alpha) - x_p)^2 + (y(\alpha) - y_p)^2}$. Cette distance minimale est appelée r_{min} , et les deux quantités sont représentées en rouge sur la Fig. 3.4C. En d'autres termes, r_{min} est la plus petite longueur entre le pilier et le contour de l'ellipse. L'angle α_{min} est l'angle entre l'avant de l'ellipse orientée et le point de l'ellipse pour lequel la distance r_{min} est atteinte. Par exemple, lorsque l'ellipse est tangente au cercle en son centre, $r_{min} = 0$, $\alpha_{min} = 90^\circ$ et $\theta_{in} = 90^\circ$.

3.1.3.4 Sélection des évènements

Les évènements d'interaction qui durent 4 images (80 ms) ou moins, sont rejetés. Ceux qui durent plus de 110 images (2,2 s) sont rejetés. Ces derniers correspondent souvent à des paramécies immobilisées à l'intérieur de la couronne d'interaction. Ces deux critères ont été choisis après inspection visuelle de films enregistrés. Les changer légèrement ou les retirer ne change pas significativement les résultats obtenus par la suite.

Les évènements présentant des sauts d'images entre l'entrée et la sortie de la couronne d'interaction sont retirés, car ils peuvent échapper aux critères de détection des algorithmes. De la même manière, les évènements qui ne débutent ou ne finissent pas à proximité du rayon d'interaction (à cause d'un saut d'image par exemple) sont retirés. Pour cela, on estime que le déplacement maximal entre deux instants successifs séparés de 20 ms est $\Delta r_{max} = 1200 \mu\text{m}$. Si au premier ou au dernier instant détecté dans la couronne d'interaction, la distance r entre le centre de l'ellipse et le centre du pilier est inférieure à $r_{int} - \Delta r_{max}$, alors l'évènement est rejeté.

A noter qu'il est tout à fait possible, notamment dans le cas des réseaux de piliers aléatoires, qu'une même paramécie soit comptabilisée à un instant donné comme interagissant avec deux piliers voisins, si leurs centres sont séparés d'une distance inférieure à $2r_{int}$. Ces évènements sont pris en compte.

3.1.4 Interactions de contact

Comment s'assurer qu'une paramécie et un pilier sont bien en contact? Cette section présente une méthode pour détecter les interactions de contact entre une paramécie et un pilier. Les résolutions temporelle (50 Hz) et spatiale (1 pixel = $3.8 \mu\text{m}$) de notre système expérimental limitent la détection du contact entre la membrane de la paramécie ou ses cils et la surface rigide du pilier. Nous avons donc utilisé des quantités macroscopiques comme la vitesse ou l'angle d'incidence pour construire un algorithme de détection des

contacts. Ainsi, nous détectons un contact entre une paramécie et un pilier si et seulement si deux conditions sont respectées :

1. La distance bord à bord entre les deux objets est suffisamment faible : $r_{min}(t) < r_c$, où $r_c = 161.5 \mu\text{m}$ est le rayon d'une couronne de contact.
2. Si son angle d'incidence à son entrée dans la couronne de contact est suffisamment faible : $\theta_i < 47,8^\circ$.

S'il y a contact, alors l'instant de la collision est détecté comme correspondant à l'instant du premier minimum de la vitesse instantanée de la paramécie.

3.1.4.1 Critère sur la distance : couronne de contact

La première condition pour qu'une interaction donne lieu à un contact est que $r(t) < r_c$, c'est-à-dire qu'au moins un point de l'ellipse se situe à l'intérieur de la couronne de contact, ou autrement dit, que la surface de l'ellipse et celle du pilier se superposent. Quelques-uns de ces paramètres géométriques sont représentés sur la Fig. 3.5A. Comment choisir r_c de manière non arbitraire ?

Le rayon de la couronne de contact r_c est obtenu après inspection visuelle d'évènements d'interaction passifs (c'est à dire en l'absence d'AR dans toute la couronne d'interaction), avec ou sans contact. Visuellement, une collision se caractérise par une brusque variation angulaire et parfois de vitesse instantanée. Nous avons fait varier l'épaisseur de la couronne de contact $\delta r = r_c - r_p$ entre 3, 4, 5 ou 6 fois la taille d'un pixel soit respectivement $11.4 \mu\text{m}$, $15.2 \mu\text{m}$, $19.0 \mu\text{m}$ ou $22.8 \mu\text{m}$ et tiré aléatoirement puis inspecté des évènements d'interaction à l'issue de chacune des 3 analyses. Si δr est trop grand, nous détectons des évènements d'interaction avec contact, alors qu'il n'y a pas de contact lors d'une inspection visuelle. Si δr est trop petit, des évènements d'interaction avec contact sont visibles mais non détectés par l'algorithme. Il s'est avéré que prendre $\delta r = 19 \mu\text{m}$ est un compromis acceptable, ce qui donne ainsi $r_c = 161.5 \mu\text{m}$.

3.1.4.2 Contrôle de r_p et r_c

Nous avons confirmé ce choix *a posteriori* en calculant la densité de probabilité de $r_{min}^* = \min\{r_{min}(t) | t \in [t_i, t_o]\}$ qui définit la plus petite longueur entre l'ellipse et le centre du pilier atteinte pendant $[t_i, t_o]$ pour une interaction donnée. Pour rappel, t_i (*resp.* t_o) est l'instant où le centroïde de l'ellipse entre (*resp.* quitte) la couronne d'interaction. Pour tous les évènements d'interaction passifs ($N = 28031$, pour toutes les topologies et tous ϕ), la densité de probabilité de r_{min}^* présente deux régions distinctes (Fig. 3.5B, étoiles noires) : dans l'intervalle $[120, 160] \mu\text{m}$, r_{min}^* suit une loi gaussienne (voir la courbe noire de la 3.5B, qui montre un ajustement avec une loi gaussienne des données expérimentales

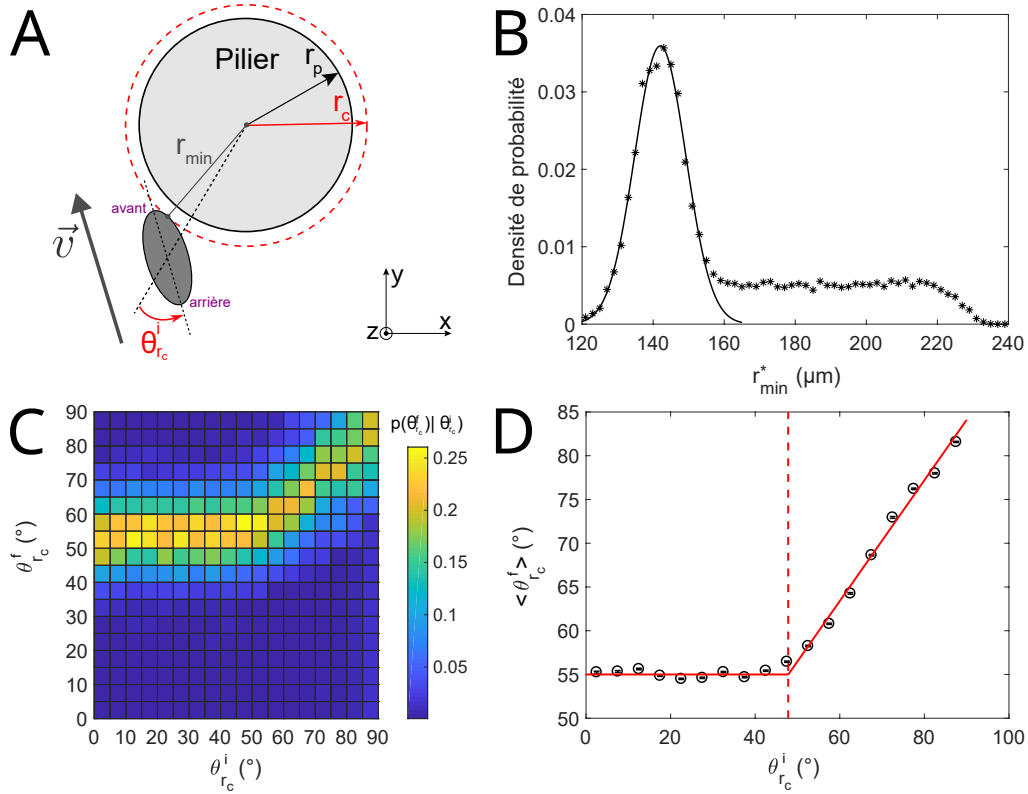


FIG. 3.5 Détection des contacts. (A) Schéma d'une paramécie entrant dans la couronne de contact. (B) Densité de probabilité r_{min}^* , la plus petite distance au pilier pendant une interaction, calculé pour toutes les interactions passives (étoiles noires, $N = 28031$). La largeur du bin est de $2 \mu\text{m}$. La ligne noire continue est un ajustement gaussien de la densité de probabilité sur l'intervalle $[120; 155] \mu\text{m}$ ($R^2 = 0.99$), donnant une valeur moyenne pour r_{min}^* , $m_c = 142 \mu\text{m}$ et déviation standard $\sigma_c = 7.2 \mu\text{m}$. (C) Carte 2D de la probabilité conditionnelle $P(\theta_{r_c}^f | \theta_{r_c}^i)$ pour $\theta_{r_c}^i$ et $\theta_{r_c}^f$ variant entre 0° and 90° . Chaque bin carré a un côté de longueur 5° . Cette figure a été obtenue avec $N = 28031$ interactions passives. (D) Angle final moyen $\langle \theta_{r_c}^f \rangle$ et erreur standard à la moyenne en fonction de $\theta_{r_c}^i$, où $\theta_{r_c}^i$ est pris au centre de chaque bin. La ligne rouge continue est un ajustement linéaire de chaque régime qui s'intersectent à $\tilde{\theta}_{r_c}^i = 47.8^\circ$, marqué par une ligne rouge verticale pointillée.

avec une valeur moyenne $m_c = 142 \mu\text{m}$ et une déviation standard $\sigma_c = 7.2 \mu\text{m}$, $R^2 = 0.99$) tandis que dans l'intervalle $[\simeq 160, 220] \mu\text{m}$, r_{min}^* est uniformément distribué. La première région est une signature directe des interactions avec contact entre les paramécies et les piliers. La valeur moyenne $m_c = 142 \mu\text{m}$ est très proche de la mesure optique du rayon des piliers $r_p = 142.5 \mu\text{m}$ et la déviation standard $\sigma_c = 7.2 \mu\text{m}$ est une conséquence directe des erreurs sur la procédure d'ajustement elliptique de la forme des paramécies. En effet, puisque les piliers imposent une contrainte rigide sur les paramécies, on s'attend à ce qu'en moyenne elles ne puissent jamais se situer à une distance inférieure au rayon des piliers. Toutefois, puisque la forme réelle de la paramécie n'est pas vraiment une ellipse, une paramécie en contact avec un pilier peut induire une superposition entre l'ellipse et le pilier, donnant des valeurs $r_{min} < r_p$. Le second régime est quant à lui une signature des interactions sans contact et est, de manière prévisible, uniforme.² Les deux régimes sont séparés à $r_{min}^* \simeq 160 \mu\text{m}$. Ce seuil permet de confirmer une épaisseur de couronne $\delta r \simeq 17.5 \mu\text{m}$ qui est très proche de la valeur empirique obtenue par la méthode d'essai-erreur et d'inspection visuelle décrite plus haut.

3.1.4.3 Critère angulaire

Nous nous sommes toutefois aperçus qu'un critère en distance n'était pas suffisant. A cause des différences de taille entre les cellules ou à cause des erreurs sur l'ajustement de la paramécie par une ellipse, certaines paramécies naviguaient dans la couronne de contact sans pour autant toucher le pilier. Nous avons donc ajouté un critère angulaire pour trier ces événements. Au dessus d'une certaine incidence θ_{in} à un instant fixé comme l'entrée dans la couronne de contact $r_{r_c}^i$, la paramécie ne touche statistiquement pas l'obstacle. Puisqu'il n'a pas été possible d'obtenir une expression analytique d'un angle seuil en fonction des paramètres géométriques du problème, nous avons eu recours à une méthode empirique, inspirée de Contino *et al.* [93]. Nous avons calculé la carte de probabilité conditionnelle $P(\theta_{r_c}^f | \theta_{r_c}^i)$, où $\theta_{r_c}^i = \theta_{in}(t_{r_c}^i)$ et $\theta_{r_c}^f = \theta_{in}(t_{r_c}^f)$ sont respectivement l'angle d'incidence lorsque la paramécie entre dans la couronne et lorsqu'elle en sort, tout en satisfaisant $r_{min}(t) < r_c$ à chaque instant (Fig. 3.5C). Nous utiliserons la même méthode dans la section 3.2 et la détaillerons plus amplement. En bref, cette carte de probabilité met en évidence deux régimes. Un régime constant à faible $\theta_{r_c}^i$, où l'angle final $\theta_{r_c}^f$ ne dépend pas de l'angle initial, signature d'un contact. Et un régime linéaire à grand $\theta_{r_c}^i$ où l'angle final est proportionnel à l'angle initial, signature d'une interaction hydrodynamique sans contact. La transition entre ces deux régimes est notée $\tilde{\theta}_{r_c}^i$ et est obtenue en calculant

2. La décroissance de r_{min}^* observée au delà de $220 \mu\text{m}$ est simplement due à un effet statistique lié à la taille finie de la couronne d'interaction ($r_{int} = 256 \mu\text{m}$) dans laquelle sont comptés ces événements.

l'angle moyen $\langle \theta_{r_c}^f \rangle$ en fonction de $\theta_{r_c}^i$ (Fig. 3.5D, cercles noirs). Cette courbe peut être modélisée et ajustée par la fonction suivante (ligne rouge continue sur la Fig. 3.5D) :

$$\langle \theta_{r_c}^f \rangle (\theta_{r_c}^i) = \begin{cases} \tilde{\theta}_{r_c}^f & \text{si } \theta_{r_c}^i < \tilde{\theta}_{r_c}^i \\ m\theta_{r_c}^i + q & \text{si } \theta_{r_c}^i \geq \tilde{\theta}_{r_c}^i \end{cases} \quad (3.4)$$

Cela donne $\tilde{\theta}_{r_c}^f = 55^\circ$ (sur l'intervalle $[0, 40]^\circ$, $R^2 = 0.99$), $m = 0.69$ et $q = 21.8^\circ$ (sur l'intervalle $[50, 90]^\circ$, $R^2 = 0.99$). L'intersection entre ces deux régimes donne le seuil $\tilde{\theta}_{r_c}^i = 47.8^\circ$ (Fig. 3.5D, ligne rouge verticale pointillée), en dessous duquel une interaction conduit statistiquement à un contact et au dessus duquel il n'existe statistiquement pas de contact physique entre une paramécie et un pilier.

Ainsi, nous considérons, en accord avec nos inspections visuelles de trajectoires avec contact qu'une interaction donne lieu à un contact si et seulement si :

1. $\exists t \in [t_i, t_o] | r_{min}(t) < r_c = 161.5 \mu\text{m}$
2. $\theta_{r_c}^i \doteq \theta_{in}(t_{r_c}^i) < \tilde{\theta}_{r_c}^i = 47.8^\circ$

3.1.4.4 Détection de l'instant de la collision

Si il y a contact, alors l'instant de premier contact, ou instant de la collision, noté t_c^i correspond à l'instant pour lequel la vitesse instantanée $v(t)$ atteint son premier minimum, tant que $t \in [t_{r_c}^i, t_{r_c}^f]$.

3.1.5 Statistiques

La tableau 3.1 résume les principales statistiques issues des analyses de données pour les expériences dans des environnements à obstacles, à fraction de surface (de $\Phi = 0$ à $\Phi = 0,28$) et topologie (carré, aléatoire ou sans obstacle) variées.

3.2 Interactions passives

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au comportement passif des paramécies, c'est-à-dire en l'absence d'AR, au voisinage d'un obstacle. Pour quantifier leur comportement, nous avons suivi la même approche que Kantsler *et al.* [92] et Contino *et al.* [93] en étudiant comment la paramécie interagit avec l'obstacle en fonction de l'angle d'incidence, en l'absence d'AR. Nous notons θ_i (*resp.* θ_o) l'angle d'incidence au moment où le centroïde d'ellipse ajustée à la paramécie entre (*resp.* sort) de la couronne d'interaction, de rayon r_{int} (Fig. 3.6A, encart).

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0,083	8	340	71,4	583	781
0,14	13	932	237	3133	4728
0,20	9	512	122	1616	3030
0,28	9	267	65,2	910	2425

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0,012	13	903	202	2405	278
0,083	6	251	88,2	1257	645
0,14	10	677	174	2407	3249
0,28	7	431	74,4	586	3073

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0	10	564	136	1457	0

TABLE 3.1 – Résumé des principales statistiques issues des données d’analyse pour les expériences dans des environnements à fraction de surface et topologie d’obstacles variés, pour $r_p = 142,5 \mu\text{m}$. Les tableaux du haut, du milieu et du bas correspondent respectivement à une topologie carrée, aléatoire et sans obstacle. On notera Φ la fraction de surface des obstacles, M le nombre d’expérience par condition, N_{traj} le nombre total de trajectoires pour toutes les expériences correspondant à une condition donnée, T_{obs} le temps total d’observation des trajectoires (en minutes), N_{AR} le nombre total d’AR et N_c le nombre total d’évènements de contact.

Nous avons mesuré θ_i et θ_o et calculé la carte 2D de probabilité conditionnelle $P(\theta_o|\theta_i)$ sur $N = 28031$ interactions passives (en l’absence d’AR) compilée à partir de $M = 75$ expériences indépendantes avec Φ variant entre 0.01 et 0.28 pour des réseaux aléatoires ou carrés (Fig. 3.6A). En dessous d’un angle d’incidence seuil $\tilde{\theta}_i^z = 41 \pm 3,7^\circ$, les paramécies quittent toujours les piliers avec le même angle $\langle \tilde{\theta}_o \rangle \simeq 40 \pm 0,22^\circ$. Dans ce cas, il n’y a alors pas de mémoire de l’angle d’entrée θ_i . Au dessus de $\tilde{\theta}_i$, l’angle moyen $\langle \tilde{\theta}_o \rangle$ dépend linéairement de θ_i avec une pente $m = 0,94 \pm 0,031$ et une ordonnée à l’origine $q = 1,6 \pm 2,0^\circ$ où les erreurs sont les intervalles de confiance à 95%, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0.99$ (Fig. 3.6B).

Ces mesures pour le régime de contact sont cohérentes avec nos observations qu’au contact, la paramécie se réoriente contre le pilier, s’aligne puis glisse le long du pilier avant de le quitter de manière tangente, indépendamment de l’angle d’entrée. Ces observations

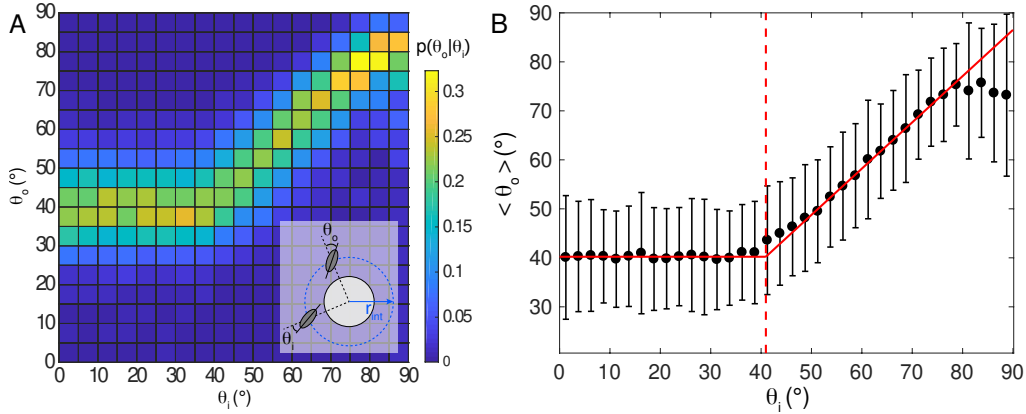


FIG. 3.6 *Caractérisation des interactions passives. (A) Probabilité conditionnelle $P(\theta_o|\theta_i)$ pour θ_i et θ_o qui varient entre 0° et 90° . Chaque bin carré a un côté de longueur 5° . Cette figure a été obtenue avec $N = 28031$ interactions passives compilées à partir de $M = 75$ expériences indépendantes avec Φ variant entre 0.01 et 0.28 pour des réseaux aléatoires ou carrés. Encart : schéma des paramètres géométriques, avec l'angle d'incidence et l'angle de sortie ainsi que la couronne d'interaction en pointillés bleus et le rayon du pilier en noir. (B) Angle final moyen $\langle \theta_o \rangle$ et erreur standard à la moyenne en fonction de θ_i , où θ_i est pris au centre de chaque bin. La ligne rouge continue est un ajustement linéaire du régime de contact et du régime hydrodynamique qui s'intersectent à $\tilde{\theta}_i = 41^\circ$, marqué par une ligne rouge verticale pointillée. Dans le régime hydrodynamique, un ajustement linéaire sur $\theta_i \in [50, 80]^\circ$ donne une pente $m = 0,94 \pm 0,031$ et une ordonnée à l'origine $q = 1,6 \pm 2,0^\circ$ où les erreurs sont les intervalles de confiance à 95%, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0.99$.*

sont caractérisées plus amplement dans la section 3.2.2. Enfin, la carte de probabilité conditionnelle $P(\theta_o|\theta_i)$ montrée en Fig. 3.6A est très similaire à celle mesurée par Contino *et al.* [93] pour la micro-algue biflagellée *Chlamydomonas reinhardtii*, ce qui suggère un comportement au contact universel parmi les micro-organismes, indépendamment du type de nage.

Dans les deux sections suivantes, nous caractériserons plus amplement les interactions hydrodynamiques et les interactions de contact au voisinage d'un pilier.

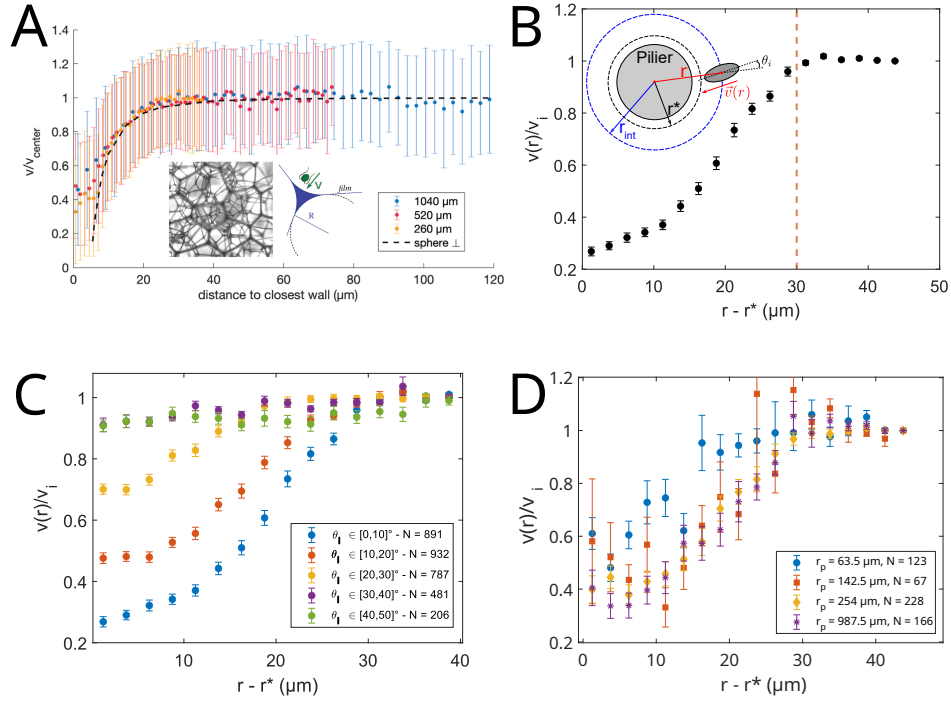


FIG. 3.7 Interactions hydrodynamiques. Vitesse moyenne de *Chlamydomonas* en fonction de la distance au mur le plus proche (en microns), redimensionnée par la vitesse de nage au centre de la chambre, dans le cas de trois chambres de rayon $R = 260 \mu\text{m}$ (disques bleues), $R = 520 \mu\text{m}$ (disques rouges) et $R = 1040 \mu\text{m}$ (disques jaunes). Les barres d'erreur montrent la déviation standard. La ligne pointillée est la vitesse d'une sphère de $10 \mu\text{m}$ de diamètre confinée entre des murs séparés de $20 \mu\text{m}$ et approchant en incidence normale un troisième mur, obtenue par simulations numériques. Encart : (gauche) Image d'une mousse liquide laissant apparaître le squelette qui délimite les chambres ; (droite) Schéma en coupe de l'intersection de 3 films de savon délimitant en leur centre (région bleue) un canal dans lequel naviguent *Chlamydomonas*. La figure est adaptée de Théry *et al.* [94]. (B) Vitesse instantanée de *Paramecium* redimensionnée par la vitesse à t_i en fonction de la distance centre à centre au pilier r , soustraite par le rayon du volume exclu $r^* = r_p + a = 211 \mu\text{m}$. Seules les cellules à incidence quasi-normale sont sélectionnées, $\theta_i \in [0, 10]^\circ$ pour un total de $N = 891$ interactions (réseau carré, $\phi = 0.14$). La largeur d'un bin est de $2.5 \mu\text{m}$. La ligne verticale rouge pointillée marque la distance d'interaction hydrodynamique, à environ $30 \mu\text{m}$. Encart : schéma des paramètres géométriques utilisés pour l'analyse. (C) Vitesse instantanée redimensionnée en fonction de la distance centre à centre au pilier pour différents choix d'incidence θ_i . (D) Vitesse instantanée redimensionnée en fonction de la distance centre à centre au pilier pour différents réseaux d'obstacles à r_p varié et à $r_{\text{int}} - r_p$ constant, avec $\theta_i \in [0, 10]^\circ$.

3.2.1 Interactions hydrodynamiques

3.2.1.1 Effet sur la vitesse

A quelle portée les interactions hydrodynamiques sont-elles senties par les paramécies ? Observe-t-on un effet à longue portée sur leur vitesse de nage ? Pour comprendre cela, nous nous sommes inspirés des travaux récents de Théry *et al.* [94] dans lesquels les microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* sont piégées dans un canal formé par l'intersection de 3 bulles de savon de rayon R contrôlé et qui interagissent avec ses parois concaves [95]. Ils observent une diminution de la vitesse due aux interactions hydrodynamiques avec les parois à partir d'une distance d'environ $30\ \mu\text{m}$ (Fig. 3.7A).

Dans notre cas, nous avons calculé la vitesse instantanée $v(r)$ des paramécies en fonction de la distance centre à centre au pilier r en excluant le volume inaccessible pour une cellule en incidence normale, donné par un rayon $r^* = r_p + a = 211\ \mu\text{m}$, entre l'instant où son centroïde entre dans la couronne d'interaction à t_i et l'instant de la collision à t_c^i . La vitesse instantanée est redimensionnée par la vitesse loin de l'obstacle, choisie à t_i et notée v_i . Seules les paramécies en incidence normale sont sélectionnées ($\theta_i \in [0, 10]^\circ$) de sorte à s'extraire des effets dus à l'orientation des cellules. Les résultats sont montrés en Fig. 3.7B. On distingue très clairement une baisse de vitesse d'environ 80% au plus proche du pilier et une distance d'interaction d'environ $30\ \mu\text{m}$ (ligne pointillée rouge). Lorsque l'angle d'incidence est varié (Fig. 3.7C), l'effet sur la vitesse est moins fort : $\simeq 80\ \%$ pour $\theta_i \in [0, 10]^\circ$ (disques bleus), $\simeq 60\ \%$ pour $\theta_i \in [10, 20]^\circ$ (disques rouges), $\simeq 30\ \%$ pour $\theta_i \in [20, 30]^\circ$ (disques jaunes), et moins de $10\ \%$ pour $\theta_i \in [30, 40]^\circ$ (disques violets) et $\theta_i \in [40, 50]^\circ$ (disques verts). La distance d'interaction semble toutefois peu varier. Nous avons également fait varier la surface d'interaction, en changeant le rayon des piliers jusqu'à un facteur 10 entre les plus petits et les plus grands piliers. Nous nous attendons à ce qu'un pilier étroit cause de plus faibles interactions hydrodynamiques avec la paramécie qu'un large pilier. La Fig. 3.7D montre la vitesse instantanée redimensionnée $v(r)/v_i$ en fonction de la distance $r - r^*$ pour 4 rayons de piliers différents : $r_p = 63,5\ \mu\text{m}$, $r_p = 142,5\ \mu\text{m}$ (piliers habituels), $r_p = 254\ \mu\text{m}$ et $r_p = 987,5\ \mu\text{m}$. Mis à part pour $r_p = 63,5\ \mu\text{m}$ qui semble présenter une distance d'interaction hydrodynamique autour de $20\ \mu\text{m}$, de manière surprenante, l'effet ne semble pas modifié par r_p . Nous n'avons pas d'explication claire là-dessus. Il est possible que la gamme de variation ne soit pas assez grande. Si l'on définit un rapport de taille comme la largeur de l'objet sur la largeur de l'obstacle, on a $2b/2r_p$ qui vaut respectivement 0,5, 0,2, 0,1, 0,03 du plus petit au plus grand pilier et pour une paramécie ajustée par une ellipse de demi-petit axe $29,45 \pm 4,4\ \mu\text{m}$. Même pour $r_p = 63,5\ \mu\text{m}$, l'obstacle reste plus large que la paramécie, et c'est pourtant cette condition qui laisse deviner une baisse dans la force des interactions hydrodynamiques. Il

n'est malheureusement pas possible de réduire d'un autre ordre de grandeur la taille des piliers (par exemple $r_p \simeq 10 \mu\text{m}$) en conservant le même rapport d'aspect avec les mêmes méthodes de micro-usinage et de moulage en PDMS. Cette étude sera donc l'objet d'un autre travail.

Il est également surprenant de retrouver la même distance d'interaction qu'avec *Chlamydomonas* étant donné la différence entre les deux systèmes. Dans notre cas, le rapport de taille cellule-pilier $2b/2r_p$, prend les valeurs 0,5, 0,2, 0,1, 0,03 alors qu'il varie entre 0,005 et 0,02 dans le cas du système expérimental décrit plus haut. En conclusion, malgré la différence entre les deux systèmes, à la fois dans les dimensions physiques et dans le type de nageur (cilié contre flagellé), nous retrouvons les mêmes interactions hydrodynamiques sur la vitesse, avec dans les deux cas, une absence de dépendance claire avec la courbure des obstacles.

3.2.1.2 Effet sur l'angle d'incidence

La figure 3.7C nous a montré que l'angle d'incidence avait une influence sur les interactions hydrodynamiques. Quelle est l'influence de la géométrie du problème (région circulaire de rayon r_{int} , taille de la paramécie, taille de l'obstacle, etc) sur les interactions hydrodynamiques? Dans un premier temps, nous allons nous demander ce que serait la distribution d'angle d'incidence théorique pour des objets en incidence sur une région circulaire, en l'absence d'obstacle central.

Si l'on découpe artificiellement un disque de rayon 1 (considérer un disque de rayon r_{int} est complètement équivalent) en plusieurs bandes de largeur égale, on peut s'intéresser à la variable aléatoire X qui décrit la position linéaire x d'un objet par rapport à un axe centré sur le disque et qui coupe perpendiculairement les bandes, comme schématisé en Fig. 3.8A. On peut se restreindre à un demi-cercle par symétrie. Étant donné que les paramécies sont uniformément réparties dans l'espace et qu'il n'y a pas de direction privilégiée, les paramécies sont également uniformément réparties dans toutes les bandes. Autrement dit, la variable aléatoire X qui décrit la position x de la paramécie suite une loi uniforme sur $[0, 1]$ dont la densité de probabilité est notée $f_X = 1$. D'autre part, pour une paramécie située sur le cercle, à une distance linéaire x du centre, et avec une orientation fixée (pour se convaincre que le problème est généralisable à toutes les orientations, il suffit d'effectuer une rotation du schéma en Fig. 3.8A), la distance x et l'angle d'incidence θ_i sont liés par la simple loi géométrique :

$$x = \sin(\theta_i) \tag{3.5}$$

Si on note Θ la variable aléatoire qui décrit l'angle d'incidence θ_i , sa densité de probabilité

est donnée par :

$$\Theta = g(X) \quad (3.6)$$

où g est la fonction définie sur $[0, 1]$ par :

$$g: x \longmapsto \sin^{-1}(x) \quad (3.7)$$

En appliquant la formule pour la densité de probabilité d'un changement de variable, il suit :

$$f_{\Theta}(\theta) = f_X(g^{-1}(\theta)) \left| \frac{d}{d\theta} g^{-1}(\theta) \right| \quad (3.8)$$

$$= \left| \frac{d}{d\theta} \sin(\theta) \right| \quad (3.9)$$

$$= |\cos(\theta)| \quad (3.10)$$

Ainsi, la densité de probabilité des angles d'incidence θ_i pour des objets sur un cercle est donnée par :

$$f_{\Theta}(\theta) = |\cos(\theta)| \quad (3.11)$$

Nous avons voulu vérifier expérimentalement ce résultat en guise de contrôle. Pour cela, nous avons distribué les coordonnées de piliers "fictifs" de manière aléatoire à $\Phi = 0.28$ pour les données en nage libre, en appliquant l'analyse des évènements d'interactions paramécie-pilier. Cela permet d'obtenir une distribution d'angle d'incidence sur une couronne de rayon r_{int} pour les mêmes paramécies, mais en l'absence d'obstacle. Ce contrôle nous a donné un nombre de $N = 7581$ interactions, et le même nombre de valeurs pour θ_i . Enfin, dans le cas avec obstacles, pour garder le nombre d'évènements constant, nous avons sélectionné aléatoirement $N = 7581$ interactions parmi toutes les interactions provenant de toutes les données en milieu encombré (tous Φ , carré et aléatoire). Nous avons ensuite calculé les densités de probabilité empiriques et les résultats sont montrés en Fig. 3.8B où la courbe théorique $\cos(\theta)$ (ligne rouge continue) et le contrôle expérimental (losanges rouges) se superposent tandis que la courbe expérimentale provenant des expériences en milieu encombré (disques bleus) se distinguent nettement des deux autres, signature d'interactions hydrodynamiques. Un ajustement par une fonction cosinus des courbes expérimentales confirme cette observation : pour le contrôle, le coefficient de détermination est de $R^2 = 0.96$ tandis que dans l'autre cas, il est de $R^2 = 0,70$.

Est-ce que les interactions hydrodynamiques sont plus faibles à plus grande distance ? Nous avons fait varier la taille de la couronne d'interaction r_{int} d'un facteur 2, entre 233.6 μm et 550.5 μm , avec $r_p = 142.5 \mu\text{m}$ fixé, et n'observons pas de différence notable entre les distributions d'angle d'incidence bien que le même effet hydrodynamique soit observé

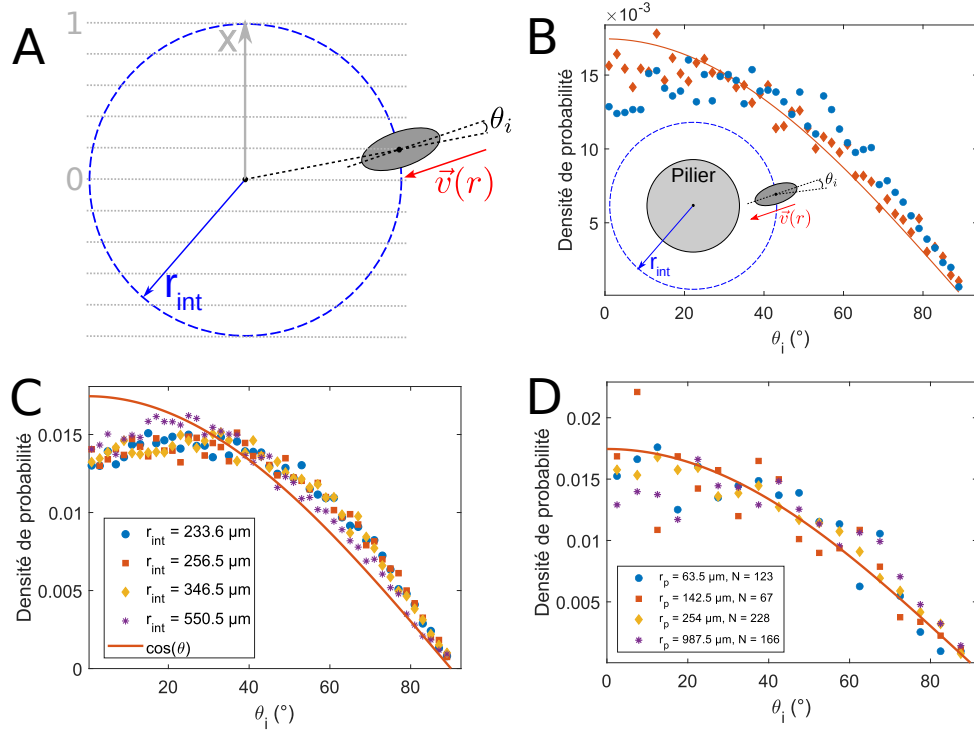


FIG. 3.8 Interactions hydrodynamiques. (A) Schéma des paramètres géométriques utilisés pour l'analyse. (B) Densité de probabilité de l'angle θ_i pour le contrôle, obtenue en absence d'obstacle (losanges rouges, $N = 7581$), et en présence d'obstacles (disques bleus, sélection aléatoire de $N = 7581$ interactions parmi tous les ϕ , carré et aléatoire) et dans le cas de la prédiction théorique $f(\theta_i) = \cos(\theta_i)$ (ligne rouge continue). La largeur d'un bin est de 2° . (C) Densité de probabilité de θ_i pour différents rayons d'interaction r_{int} à $r_p = 142,5 \mu\text{m}$ fixé. La largeur d'un bin est de 2° . (D) Densité de probabilité de θ_i pour différents rayons de piliers r_p à épaisseur de couronne $r_{int} - r_p = 114 \mu\text{m}$ fixée. La largeur d'un bin est de 5° .

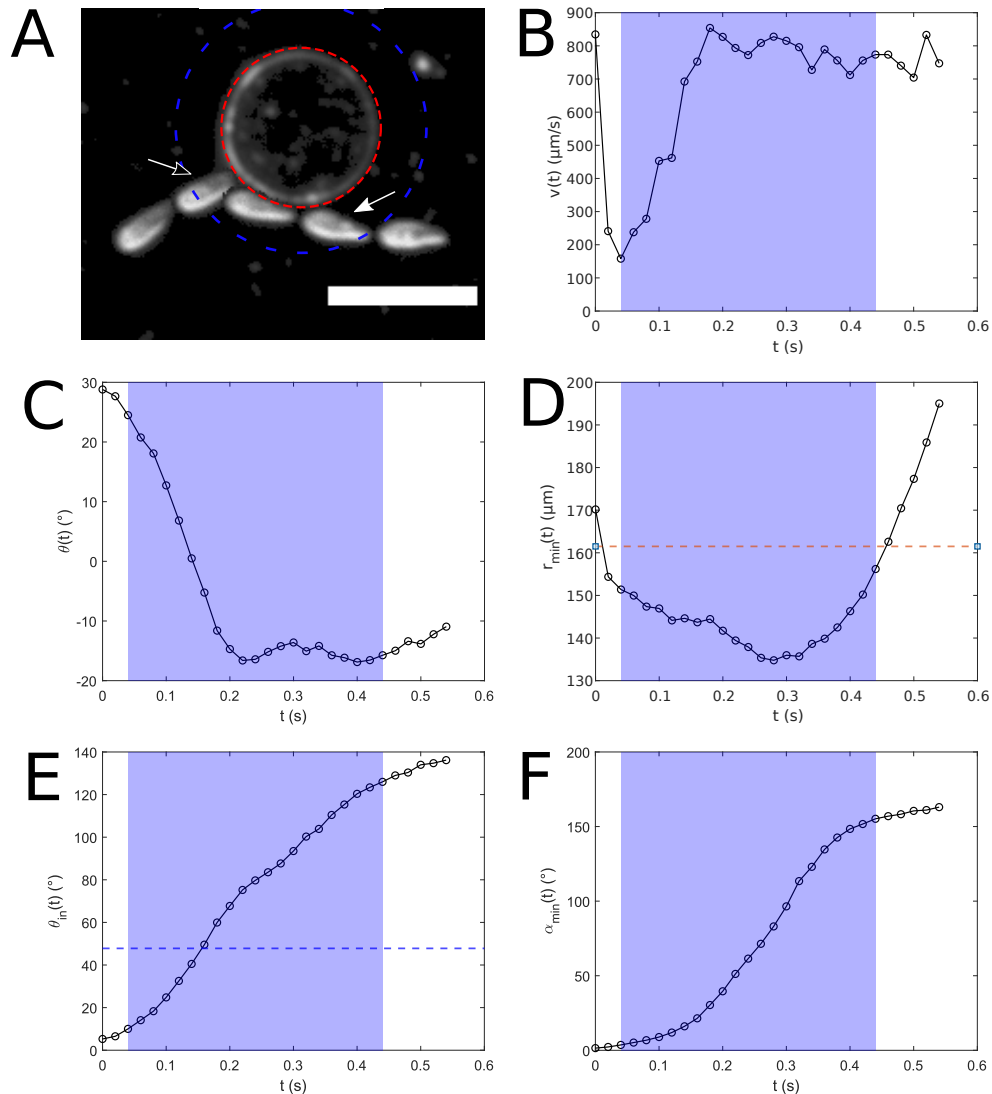
(Fig. 3.8C). Ce résultat est surprenant, mais il est possible que ces interactions aient lieu à grande distance et qu'un effet soit observé pour des plus grandes valeurs de r_{int} .

Est-ce que la taille de l'obstacle a une influence sur les effets hydrodynamiques ? En faisant varier r_p de 63.5 μm à 987.5 μm , observe-t-on une différence sur la tendance de la densité de probabilité de θ_i ? D'après les résultats montrés en Fig. 3.8D, ce n'est pas clair : les courbes expérimentales semblent plus proches de la courbe théorique en absence d'interactions hydrodynamiques, toutefois cela peut être dû à un manque de statistiques. En effet la courbe pour $r_p = 142.5 \mu\text{m}$ (carrés rouges) obtenue avec $\Phi = 0.01$ est plus proche de $\cos(\theta)$ (ligne rouge) alors que la même configuration (même r_{int} et même r_p) mais sur presque 100 fois plus de données ont montré qu'il y avait clairement une différence (Fig. 3.8B). Cela suggère que le manque de statistiques nous empêche d'apporter à cette question une réponse définitive.

3.2.1.3 Conclusion

Pour conclure, nous avons vu que les piliers induisaient des interactions hydrodynamiques sur la nage de la paramécie, en la ralentissant jusqu'à presque 80% de sa vitesse typique, avec une diminution de vitesse observée à partir de 30 μm d'un obstacle et ce, de manière indépendante de la taille de l'obstacle dans la gamme $63.5 < r_p < 987.5 \mu\text{m}$, et du type de nageur (cilié contre flagellé). D'autre part, ces interactions hydrodynamiques ont été observées sur la distribution des angles d'incidence θ_i , qui semblent quasi constant sur $\theta_i \in [0, 40]^\circ$ lorsque l'on compare à la distribution théorique et empirique en l'absence d'obstacle. Ces premiers résultats soulèvent d'autres questions, notamment sur la nature de ces interactions (attractives ou répulsives), sur l'influence de la taille des obstacles, sur le type de nageur ("pusher" contre "puller", ou autre), sur l'effet du confinement dû à nos piscines, mais ne sont pas l'objet de cette thèse.

3.2.2 Interactions de contact



(Légende sur la page suivante)

Comment la paramécie interagit-elle avec un pilier lors d'une collision dans le cas où aucune AR n'est déclenchée? La section 3.1.4 dans les *Matériels et Méthodes* a décrit comment les interactions de contact étaient détectées dans notre analyse. Une interaction de contact peut se décomposer en 3 étapes successives : tout d'abord, une collision avec le pilier, puis une réorientation contre celui-ci et enfin un glissement, comme montré sur l'exemple typique en Fig. 3.2.2A. A l'instant de la collision (Fig. 3.2.2A, $t \simeq 40$ ms), la vitesse de nage $v(t)$ atteint un minimum. Juste après, s'ensuit une phase de réorientation ($t \in [0,04; 0,18]$ s) pendant laquelle la vitesse de nage v augmente et la vitesse angulaire en norme $|\omega|$ est non nulle (Fig. 3.2.2C). La paramécie glisse ensuite contre le pilier, à vitesse

FIG. 3.9 Dynamique d'une collision en l'absence d'AR. (A) Superposition de 4 images en champ sombre, séparées par 200 ms, montrant une paramécie qui entre en collision avec un pilier. La flèche blanche creuse (resp. pleine) indique la paramécie au début (resp. à la fin) de la phase de contact à t_c^i (resp. t_c^f). Le cercle bleu (resp. rouge) en pointillé délimite la couronne d'interaction (resp. de contact). La barre d'échelle est de $300 \mu\text{m}$ de long. (B-F) Évolution temporelle des paramètres permettant de caractériser la dynamique d'une trajectoire de paramécie pendant l'interaction de contact montrée en Fig. 3.2.2A. Pour tous les graphes, les points sont séparés de 20 ms. (B) Vitesse de nage instantanée $v(t)$ de la paramécie. L'origine des temps $t = 0$ est choisie à l'instant t_i auquel le centroïde de la paramécie entre dans la couronne d'interaction. La région bleue correspond à la phase de contact $[t_c^i; t_c^f]$. (C) Orientation $\theta(t)$ de la paramécie relative à l'axe horizontal. (D) Distance $r_{min}(t)$ entre le centre du pilier et l'ellipse. La ligne rouge pointillée correspond au rayon r_c de la couronne de contact. (E) Angle d'incidence $\theta_{in}(t)$. La ligne bleue correspond au seuil sur la détection d'un contact $\tilde{\theta}_{r_c}^i = 47,8^\circ$ défini en section 3.1.4. (F) Angle orienté de l'ellipse $\alpha_{min}(t)$ pour lequel r_{min} est atteint (voir Fig. 3.4C) : par exemple, $\alpha_{min} = 0^\circ$ signifie que le point de l'ellipse le plus proche du pilier est situé à l'extrémité antérieure de l'ellipse.

constante d'environ $v \simeq 806 \pm 23 \mu\text{m/s}$ (Fig. 3.2.2B, $t \in [0, 2; 0, 28]$ s) et à orientation constante $\theta \simeq -15 \pm 1, 0^\circ/\text{s}$ (Fig. 3.2.2C, $t \in [0, 2; 0, 28]$ s), *i.e.* avec une vitesse angulaire nulle. On remarque que la vitesse pendant la phase de glissement est la même qu'avant la collision, lorsque la paramécie nageait librement, loin de l'obstacle (voir le premier point sur la Fig. 3.2.2B). Cela suggère que pendant la phase de glissement, la paramécie subit une contrainte sur son orientation mais pas sur sa vitesse. D'autre part, nous aurions pu nous attendre durant cette phase à ce que $r_{min}(t)$, la plus petite distance entre le centre du pilier et l'ellipse à l'instant t , soit constant puisque la paramécie et le pilier ne peuvent pas s'interpénétrer. Ce n'est pas ce que nous mesurons (Fig. 3.2.2D). Nous pouvons interpréter cela comme une conséquence directe de l'asymétrie gauche-droite de la paramécie combinée avec son mouvement de rotation autour de son grand axe, résultant en des fluctuations de l'ajustement elliptique de la cellule. Enfin, la paramécie quitte l'obstacle à orientation constante, lorsque $r_{min}(t) > r_c$, à $t = 0, 28$ s (flèche blanche pleine sur la Fig 3.2.2A).

3.3 L'OTAR, signature de la mécanosensibilité

3.3.1 Existence des OTAR

Nous avons vu dans le chapitre 2 sur le comportement en nage libre de la paramécie, que ce cilié explorait l'espace en suivant un mouvement hélicoïdal en ligne droite interrompu par des changements de directions spontanés, appelés Réactions d'Évitement ou en anglais Avoiding Reaction (AR). Dans un environnement avec obstacles, les paramécies font également des AR spontanées (SAR), loin des obstacles, et sont également déviées passivement par ceux-ci (Fig. 3.10A,B). Toutefois, nous avons également observé que des AR étaient provoquées à proximité des obstacles comme illustré sur la Fig. 3.10C. La mécanosensibilité chez la paramécie et d'autres ciliés a déjà été mise en évidence par le passé [14, 15, 16]. Lorsque la partie antérieure de la paramécie est stimulée mécaniquement, des canaux mécanosensibles s'ouvrent [9], dépolarisent la membrane et déclenchent un potentiel d'action si l'amplitude de la dépolarisation est suffisante. Le potentiel d'action provoque l'inversion de la direction de battement des cils : une AR a lieu. Puis le potentiel retourne à sa valeur de repos et les cils retrouvent leur direction de battement initiale ; la paramécie nage à nouveau en avant.

Toutefois, comment s'assurer, dans le cadre de nos expériences, que les AR proches des piliers sont bien induites par le contact avec ceux-ci et qu'il ne s'agit pas de SAR se produisant par hasard proche des obstacles ? Le but de cette section est de montrer quantitativement l'existence d'AR provoquées par le contact, que nous nommerons OTAR (Obstacle-Triggered Avoiding Reaction), par une méthode statistique simple et de distinguer ainsi deux types d'évènements au contact : OTAR et SE (Scattering Event). Pour cela, nous avons imagé des paramécies dans des piscines à obstacles distribués aléatoirement, dans le cas de la limite diluée, c'est à dire où la distance typique entre deux obstacles est grande devant la taille d'une paramécie. Dans notre cas, la distance typique entre deux obstacles est de $s = 2400 \mu\text{m}$, soit presque 20 fois la taille d'une paramécie, donnant une fraction de surface de $\Phi = 0,01$. Une telle précaution permet de s'extraire de potentiels effets de mémoire dues à des collisions successives rapprochées dans le temps, pouvant impacter la mécanosensibilité de la paramécie (voir section 3.6). Nous avons ensuite divisé l'espace autour d'un obstacle en couronnes d'épaisseur $dr \simeq 60 \mu\text{m}$, soit environ la demi longueur d'une paramécie et calculé la dépendance radiale de la fréquence d'AR, $f_{AR}(r)$, définie comme

$$f_{AR}(r) = \frac{n_{AR}(r \pm dr/2)}{T_{obs}(r \pm dr/2)} \quad (3.12)$$

où r est la distance centre à centre entre la paramécie et le pilier, n_{AR} est le nombre d'AR se produisant dans la couronne de largeur dr à la position r et T_{obs} est le temps

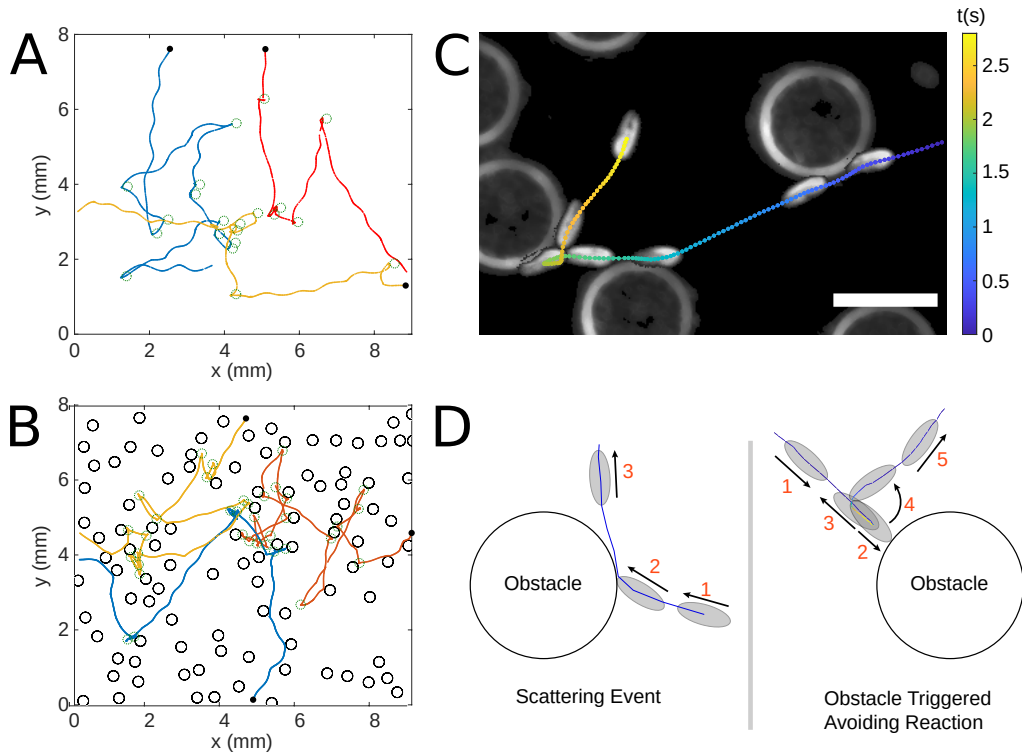


FIG. 3.10 Existence des OTAR. (A,B) Trajectoires 2D de 3 paramécies dans un environnement sans obstacle (A) et avec obstacles (B, $\Phi = 0,083$, aléatoire). Pour chaque trajectoire, un disque noir marque le dernier instant observé dans le champ de l'image. Les AR sont marquées d'un cercle vert pointillé (C) Superposition d'images en champ sombre montrant une trajectoire de paramécie dans une piscine à obstacles distribués aléatoirement ($\Phi = 0,14$). La couleur code pour le temps, en secondes. La barre d'échelle est de $300 \mu\text{m}$. (D) Schéma des deux types d'interactions au contact d'un pilier. (gauche) Scattering Event (SE), (droite) Obstacle Triggered Avoiding Reaction (OTAR). Sur chaque schéma, une flèche noire indique la direction du mouvement et des numéros indiquent les étapes successives des événements.

d'observation total des paramécies dans cette couronne (voir l'encart de la Fig. 3.11). En l'absence d'AR induite par la mécano-sensibilité, on doit observer $f_{AR}(r)$ constante avec r : les AR se produisent uniformément à différentes positions radiales r autour d'une pilier.

La figure 3.11 montre $\langle f_{AR}(r) \rangle$ en fonction de la distance à la surface d'un pilier $r - r^*$, où $r^* = r_p + b \simeq 172 \mu\text{m}$ est le rayon du volume exclu, et où $\langle \rangle$ dénotent une moyenne sur $M = 13$ expériences indépendantes. Au voisinage d'un pilier, à $r - r^* < 100 \mu\text{m}$, la fréquence d'AR spatiale est 3 fois supérieure à sa valeur loin d'un pilier, avec un maximum à $r = r^*$. Une telle augmentation est la signature nette d'une réponse mécano-sensible. De plus, la fréquence d'AR loin d'un obstacle, $r - r^* > 200 \mu\text{m}$ est proche de celle mesurée dans un environnement sans obstacle, $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle \simeq 0,165 \text{ Hz}$, ce qui signifie que le comportement loin d'un pilier est assimilable au comportement en nage libre, avec la même fréquence de SAR. Ce résultat nous permet de définir deux types d'évènements au contact : (i) les évènements de collisions passifs (Scattering Event, SE), pendant lesquels la paramécie interagit avec le pilier sans qu'aucune AR ne soit déclenchée et décrits dans la section précédente et (ii) les AR déclenchées par un obstacle (Obstacle Triggered Avoiding Reaction, OTAR). Ces deux évènements sont schématisés sur la Fig. 3.10D et la Fig. 3.10C montre une paramécie dans un environnement à obstacles distribués aléatoirement qui effectue 2 SE d'affilée avant de déclencher une OTAR sur le 3e pilier.

3.3.2 Deux types d'AR au contact et dépendance angulaire

3.3.2.1 Introduction

Des observations directes de paramécies nageant au contact d'un pilier ont révélé que toutes les OTAR n'étaient en réalité pas déclenchées instantanément (Fig. 3.12). Pour quantifier cet effet, nous avons mesuré la durée entre l'instant de collision et le début de la nage arrière qui marque le début d'une OTAR. Cette durée, notée τ , est appelée temps de déclenchement. La Fig. 3.14A montre la densité de probabilité de τ , calculée à partir d'un total de $N = 1790$ OTARs. La densité de probabilité présente deux pics, un premier pic étroit situé à $\tau \simeq 0 \text{ s}$ et un second pic plus large, autour de $\tau \simeq 0,15 \text{ s}$. Ainsi, la paramécie présente deux types de réactions : une instantanée, que l'on nommera *OTAR instantanée* ($\tau \in [0; 0,04] \text{ s}$) et une retardée, nommée *OTAR retardée* ($\tau \in]0,04; 0,6] \text{ s}$). Un exemple de chacune des deux types d'OTAR est montré en Fig. 3.12A,B. Nous avons également calculé la probabilité d'effectuer une OTAR étant donné l'angle de collision θ_c , pour chacun des deux modes et avons observé (Fig. 3.14B, cercles rouges et carrés bleus) que la probabilité de faire une OTAR instantanée dépend faiblement de l'angle de collision θ_c alors que la probabilité de faire une OTAR retardée diminue lorsque l'angle

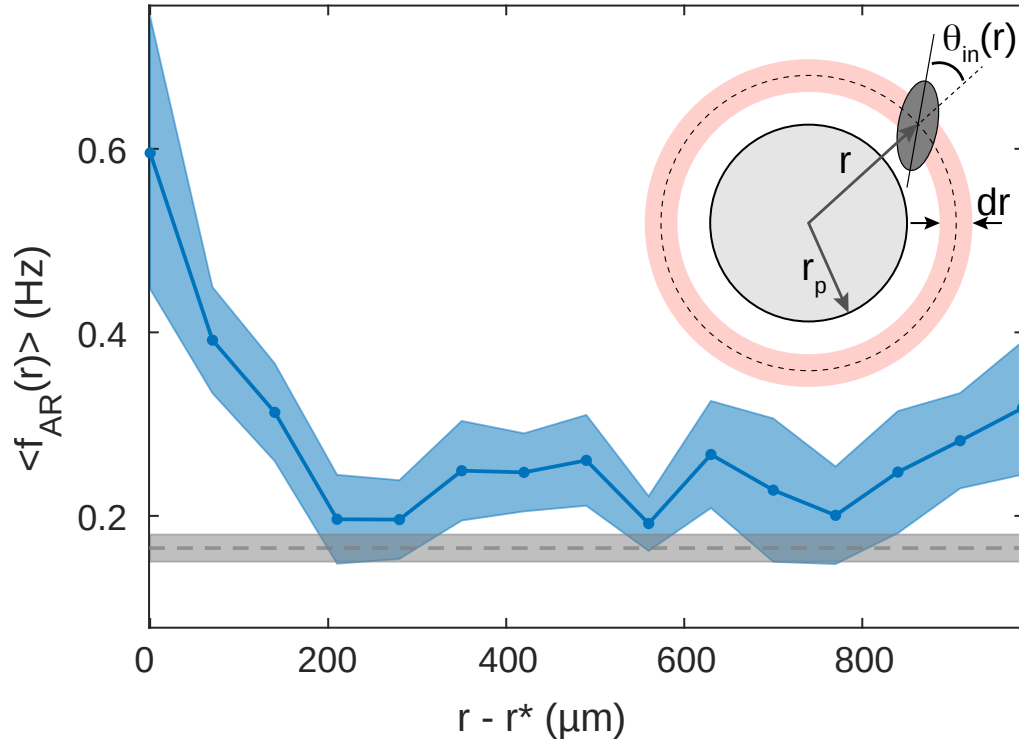


FIG. 3.11 Fréquence moyenne d'AR $\langle f_{AR}(r) \rangle$ à une distance $r - r^*$ de la surface d'un pilier. La courbe bleue est obtenue en moyennant $f_{AR}(r)$ sur $M = 13$ expériences indépendantes et la région bleue correspond à l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les expériences ont été faites dans une piscines à obstacles distribués aléatoirement, avec $\Phi = 0,01$ La ligne pointillée grise horizontale correspond à la fréquence d'AR moyenne $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle = 0,165$ Hz en absence d'obstacle et calculée sur $M = 10$ expériences indépendantes, la région grise donnant la SEM. Encart : schéma des paramètres géométriques utilisés pour l'analyse. La taille d'un bin vaut $dr = 60$ μm , ce qui correspond à la demi-longueur d'une paramécie.

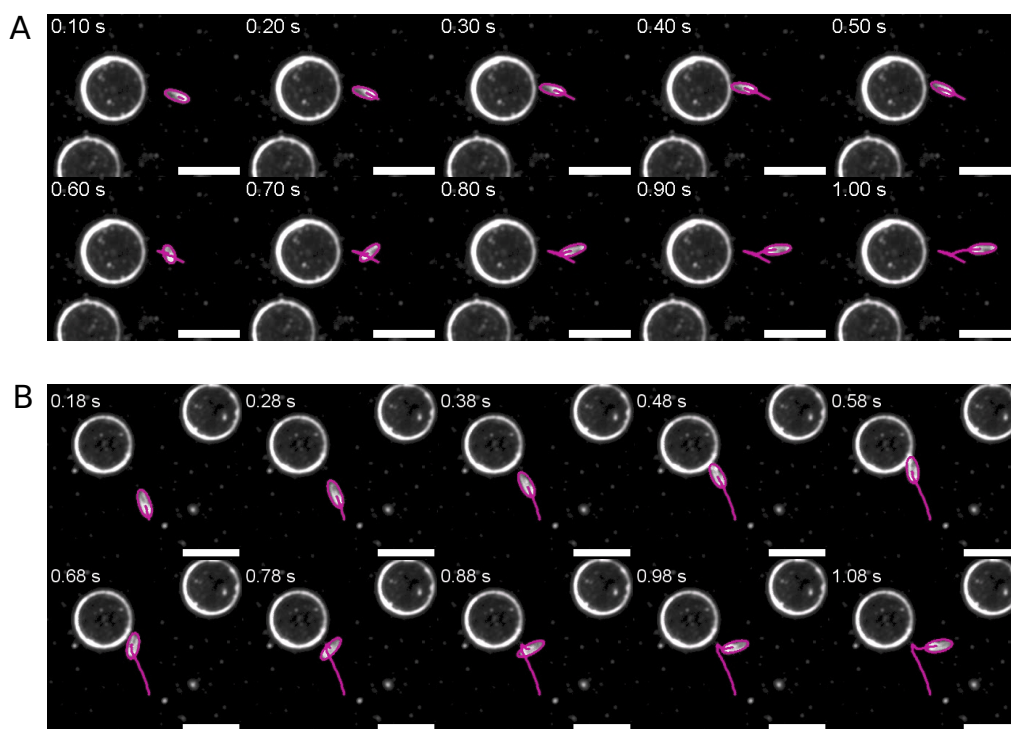


FIG. 3.12 Exemples d'OTARs instantanée et retardée. (A) Images en champ sombre d'une OTAR instantanée. La collision se produit à $t_c = 0,4$ s et le début de la nage arrière t_{BS} au même instant, donnant $\tau = 0$ s. (B) Images en champ sombre d'une OTAR retardée. La collision se produit à $t_c = 0,48$ s et le début de la nage arrière à $t_{BS} = 0,62$ s, donnant $\tau = 0,14$ s. Les barres d'échelles sont longues de $300 \mu\text{m}$.

de collision augmente. Nous présentons dans la section suivante une modélisation de ces deux réponses distinctes, basée sur des considérations électrophysiologiques. Avant cela, nous allons décrire les méthodes utilisées pour y parvenir.

3.3.2.2 Méthodes d'analyse

Classification des SE et des OTAR. Dans cette section, il a été nécessaire de définir plus finement le contact, et en particulier la fin du contact, ce qui donne lieu à une classification des OTAR et des SE spécifique (différente de celle présentée dans la section précédente), illustrée par la Fig. 3.13. Toutes ces considérations techniques ne s'appliquent qu'à la présente section 3.3.2, et pas dans le reste du manuscrit.

En raison des limitations intrinsèques de nos expériences, le contact n'a pas pu être résolu visuellement. Alors que ce n'est pas un problème à t_c^i , parce que la transition entre la phase de nage libre et la phase de contact induit une forte diminution de la vitesse et

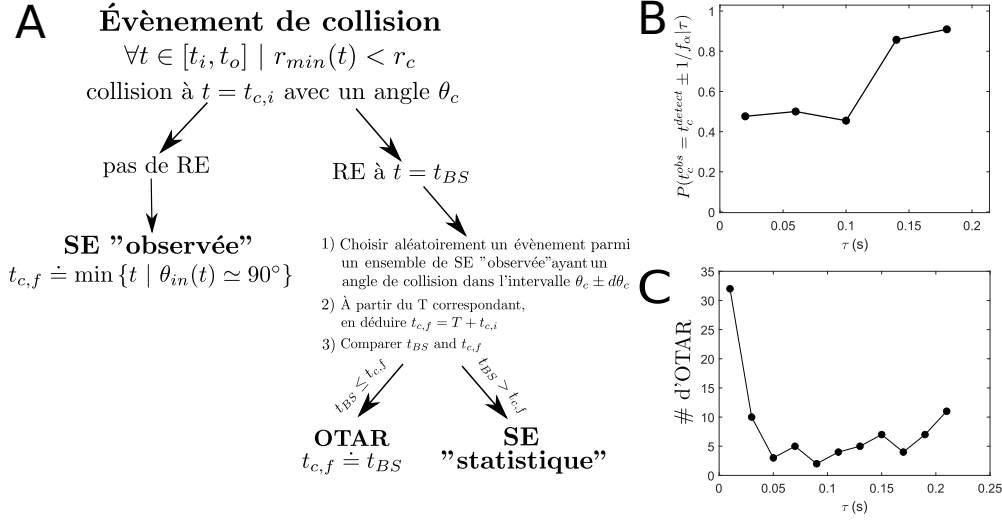


FIG. 3.13 (A) Schéma de l'algorithme de classification des SEs et des OTARs. (B) Probabilité que le temps de collision observé soit égal au temps de collision détecté, avec une tolérance de $1/f_\alpha = 0,20$ ms, sur un total de $N = 90$ OTARs inspectées, à partir de $M = 3$ expériences indépendantes. (C) Distribution des temps de déclenchement τ pour les $N = 90$ OTAR inspectées.

une déviation angulaire qui est facile à détecter visuellement et algorithmiquement, aucun critère n'a été trouvé pour détecter la fin du contact t_c^f parce que la transition de la phase de contact à la nage libre se produit à vitesse constante et à orientation constante comme le montre la Fig. 3.6B,C. Au lieu de cela, nous avons décidé de postuler que le contact se termine lorsque la cellule est tangente à l'obstacle, *i.e.* lorsque $\theta_{in}(t) \simeq 90^\circ$. Cependant, cette hypothèse raisonnable basée sur des considérations géométriques ne tient que dans le cas d'une cellule glissant passivement contre le pilier. Lorsqu'une AR est déclenché contre le pilier, la cellule se réoriente et quitte le pilier sans être nécessairement tangente au pilier.

Pour résoudre ce problème, nous avons séparé les interactions de contact en deux catégories : celles sans AR pendant $[t_{r_c}^i, t_{r_c}^f]$ (appelées SE "observé") et celles avec une AR. D'un côté, pour les SE "observés", la durée du contact est calculée directement en utilisant le critère géométrique qui définit t_c^f . De l'autre, pour un évènement de contact se produisant à t_c^i avec un angle de collision θ_c et pour lequel une AR est déclenchée à t_{BS} , le temps de fin de contact est défini comme suit.

Tout d'abord, la durée du contact T est choisie aléatoirement parmi un ensemble de données T obtenu en sélectionnant toutes les SE "observés" ayant un angle de collision dans l'intervalle $\theta_c \pm d\theta_c$, avec $d\theta_c = 5^\circ$. Puis, connaissant t_c^i , on en déduit $t_c^f = T + t_c^i$.

La comparaison de t_{BS} à t_c^f permet de définir trois cas :

1. si $t_{BS} < t_c^f$ et $t_{BS} - t_c^i \in [0, 40]$ ms, l'évènement est classé comme OTAR instantanée ;
2. si $t_{BS} \leq t_c^f$ et $t_{BS} - t_c^i \in]40, 600]$ ms, l'évènement est classé comme OTAR retardée ;
3. si $t_{BS} > t_c^f$, l'évènement est classé comme SE "statistique".

Notez que dans le cas d'une OTAR, après classification, le temps de fin de contact est redéfini comme $t_c^f \doteq t_{BS}$, de sorte que la charge de la membrane se termine dès qu'une AR est déclenchée.

L'application de cette méthode sur l'ensemble des données ($\Phi \neq 0$, réseaux aléatoires et carrés) donne 14 729 SEs (avec 14729 SE "observée" et 872 SE "statistiques"), 670 OTAR instantanées et 1120 OTAR retardées. De là, la probabilité globale d'OTAR est $P(OTAR) = 0,1$. Sauf indication contraire, dans cette section 3.3.2 uniquement, un SE fait référence à un SE "observé".

Estimation de l'erreur sur la probabilité d'OTAR conditionnelle. On notera n_{inst} le nombre d'OTARs instantanées qui effectuent une collision avec un angle $\theta_c \pm d\theta_c$ et n_c le nombre total de collisions avec un angle $\theta_c \pm d\theta_c$. Le nombre d'OTARs instantanées peut être modélisé comme n_c tirages d'une distribution binomiale de paramètre $p = n_{inst}/n_c$ et de variance $n_c p(1 - p)$. Ainsi, la probabilité conditionnelle $p = P(OTAR|\theta_c)$ représentée sur la Fig. 3.14B peut être estimée à $n_{inst}/n_c \pm \sqrt{n_c p(1 - p)}/n_c$. Le même calcul est appliqué pour les OTAR retardés.

Erreur sur l'estimation de l'instant de la collision Comme l'algorithme de détection de contact est basé sur un critère de vitesse minimale, la décélération qui se produit juste avant une nage en arrière peut conduire à des erreurs dans la détection de l'instant de la collision t_c^i à proximité d'un pilier. Puisque t_c^i est détecté comme le moment du premier minimum de vitesse lorsque la cellule est à l'intérieur de la couronne de contact, il est impossible avec notre méthode de distinguer (i) un minimum de vitesse provoqué par l'inversion dans la direction de battement des cils dû à une AR se produisant à proximité d'un pilier, (ii) d'un minimum de vitesse résultant de la contrainte rigide entre la paramécie et un pilier lors d'une collision. Cet effet est renforcé aux petits temps de déclenchement τ où les deux minima peuvent se chevaucher. Pour estimer ces erreurs, nous avons inspecté $N = 90$ OTARs de 3 expériences indépendantes, en limitant l'inspection aux OTARs avec un temps de déclenchement $\tau \leq 0,2$ s. Nous n'avons trouvé que 16,7% de faux positifs, c'est à dire de cas où aucune collision n'a été observée alors qu'une collision était détectée. La Fig. 3.13B montre le taux de faux positifs en fonction de τ . On y observe que l'erreur est plus faible à grand τ .

3.3.2.3 Une modélisation simple des OTAR

Comment la paramécie peut-elle présenter deux types de comportement distincts au contact, avec une dépendance différente avec l'angle de contact ? Des études électrophysiologiques sur des cellules immobilisées montrent qu'une stimulation mécanique de la membrane frontale déclenche un courant calcique entrant avec une latence et une durée courtes, de l'ordre de la milliseconde [13, 96]. Ce courant transitoire dépolarise ensuite la membrane et déclenche rapidement un potentiel d'action, initiant l'AR. Compte tenu de ces éléments, l'observation d'OTAR retardées de plusieurs centaines de millisecondes est surprenante. Nous proposons ici un modèle simple pour expliquer les deux types de réaction. Premièrement, étant donné que la plupart des contacts ne déclenchent pas de réaction d'évitement, nous postulons que le courant déclenché lors du contact est plus faible que lors des stimulations mécaniques typiques des cellules immobilisées. Pour déclencher un potentiel d'action, la charge Q transmise au contact doit dépasser un seuil $Q^* \approx CV^*$, où $C \approx 300$ pF est la capacité de la membrane mesurée dans notre papier [56] et $V^* \approx 3$ mV est le potentiel seuil pour déclencher un potentiel d'action par rapport au potentiel initial (ou potentiel de repos), qui quantifie l'excitabilité de la cellule [97]. Ainsi, $Q^* \approx 1$ pC. Selon l'excitabilité de la cellule à l'instant du contact, la charge transmise peut ou non déclencher un potentiel d'action.

Deuxièmement, pour expliquer les OTAR retardées, nous postulons que, en plus de la charge transmise instantanément, il existe un faible courant de transduction I_0 qui persiste tant que la cellule est en contact avec le pilier. Ceci pourrait être dû à une inactivation incomplète des canaux mécanosensibles, comme observé dans les enregistrements par Patch Clamp des canaux *Piezo* [4], ou au recrutement progressif des canaux mécanosensibles pendant le glissement, lorsque différentes parties de la membrane entrent en contact avec le pilier. Ainsi, lors du contact, une charge transmise $Q + I_0T$ s'accumule pendant un temps T jusqu'à ce qu'elle atteigne le seuil Q^* ou que la cellule quitte le pilier. Ainsi, une réaction d'évitement est déclenchée si la cellule reste en contact pendant une durée minimale $T^* = (Q^* - Q)/I_0$. Nous supposons que T^* est une variable aléatoire normalement distribuée avec une densité de probabilité p , une moyenne μ et un écart-type σ . Ce serait le cas par exemple si le potentiel de membrane était normalement distribué. Notons par ailleurs que ce potentiel membranaire est bruité [51] et que ses fluctuations spontanées sont amplifiées par un mécanisme reposant sur la concentration calcique intracellulaire [52]. Ainsi, on peut voir que trois cas peuvent se présenter : (i) pour $T^* \leq 0$, un contact déclenche instantanément une réaction d'évitement : une OTAR instantanée a lieu ; (ii) la cellule reste en contact pendant un temps T^* , puis fait une réaction d'évitement : une OTAR retardée a lieu ; (iii) la cellule quitte l'obstacle avant le temps T^* :

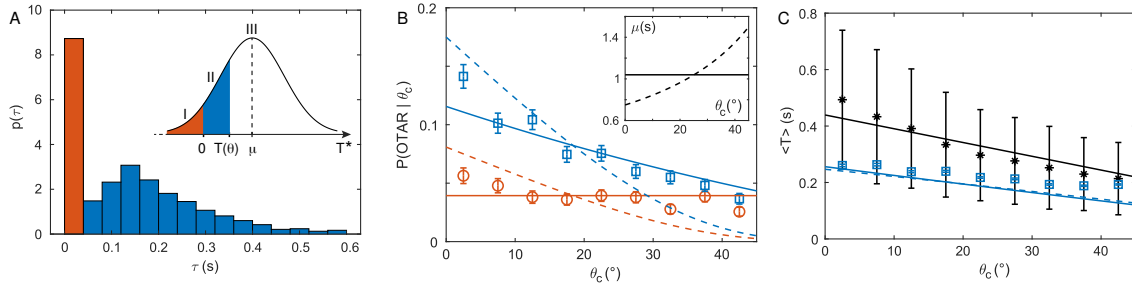


FIG. 3.14 Identification et modélisation de deux types d'OTAR. (A) Densité de probabilité du temps de déclenchement mesuré τ avec un bin de largeur $2/f_\alpha = 40$ ms. Les barres rouges et bleues correspondent respectivement aux OTARs instantanées et retardées. Encart : schéma du modèle pour la distribution de T^* , avec une moyenne μ , ainsi qu'une représentation des 3 modes. (B) Probabilité d'effectuer une OTAR instantanée (ronds rouges) ou retardée (carrés bleus) étant donné l'angle de collision θ_c , en fonction de θ_c , avec une taille de bin de 5° . Les lignes continues (resp. pointillées) représentent la probabilité d'OTAR modélisée, dans le cas uniforme (resp. non uniforme) à μ constant (resp. $\mu(\theta_c) = c/(90 - \theta_c)$). Encart : moyenne μ du temps de charge T^* en fonction de θ_c pour le modèle uniforme (ligne continue) et pour le modèle non uniforme (ligne pointillée). (C) Temps de contact moyen $\langle T(\theta_c) \rangle$ pour les SEs (étoiles noires) et pour les OTARs retardées (carrés bleus). La ligne noire continue est un ajustement linéaire des données pour les SE par l'équation 3.13, donnant $T_{max} = 0,44$ s (avec $R^2 = 0,87$). La ligne bleue continue (resp. pointillée) correspond à la prédiction du temps de contact dans le cas des OTARs retardées, avec μ constant (resp. qui dépend de θ_c).

un SE se produit.

Pour quantifier la probabilité dans chacun des cas, nous avons d'abord mesuré la durée $T(\theta_c)$ d'un SE en fonction de l'angle de contact θ_c (Fig. 3.14C, étoiles noires). Si l'on suppose, comme nos observations le suggèrent, que la cellule glisse sur le pilier jusqu'à ce qu'elle le quitte tangentiellement (Fig. 3.6), alors cette durée devrait dépendre approximativement linéairement de θ_c comme suit :

$$T(\theta_c) = T_{max}(1 - \theta_c/90) \quad (3.13)$$

En ajustant cette équation aux données pour les SE (Fig. 3.14C, ligne noire continue) cela donne $T_{max} = 0.44 \pm 0.035$ s (intervalles de confiance à 95%, $R^2 = 0.87$). La même tendance pour $T(\theta_c)$ a été mesurée pour des paramécies de type Pawn (voir section C), un mutant de *Paramecium tetraurelia* qui ne peut pas exécuter d'AR dû à l'absence de

canaux calciques voltage-dépendant dans les cils [98]. Cela confirme la nature passive des SE. On peut désormais exprimer la probabilité de chacun des 3 modes (Fig. 3.14A, encart) comme suit :

Cas 1 Une OTAR instantanée se produit, avec une probabilité

$$P_1 = \int_{-\infty}^0 p(T^*) dT^* \quad (3.14)$$

Cas 2 Une OTAR retardée se produit, avec une probabilité

$$P_2(\theta_c) = \int_0^{T(\theta_c)} p(T^*) dT^* \quad (3.15)$$

Cas 3 Un SE se produit, avec une probabilité

$$P_{SE}(\theta_c) = \int_{T(\theta_c)}^{+\infty} p(T^*) dT^* \quad (3.16)$$

Le modèle possède deux paramètres libres, μ et σ , que nous contraignons avec deux points de données expérimentales, $P_1(\theta_c \simeq 22.5^\circ)$ et $P_2(\theta_c \simeq 22.5^\circ)$. Nous obtenons $\mu \simeq 1,04$ s et $\sigma \simeq 0,59$ s, ce qui signifie qu'il faut en moyenne environ 1 s pour qu'un contact déclenche une AR.

Le modèle prédit que la probabilité d'une OTAR instantanée ne dépend pas de θ_c , en accord avec nos observations (Fig. 3.14B, ligne rouge continue), car le courant de transduction est supposé être indépendant de la position du contact. Le modèle prédit également que la probabilité d'une OTAR retardée diminue lorsque θ_c augmente, car lorsque θ_c est petit, la durée du contact augmente. Cette dépendance angulaire est en accord quantitatif avec nos observations (Fig.3.14B, ligne bleue continue rouge).

Des expériences en électrophysiologie montrent que le courant de transduction s'annule au milieu de la cellule ($\theta_c = 90^\circ$) (et devient à nouveau non nul sur la partie postérieure) [99]. Que se passerait-il si cela était pris en compte dans notre modèle, c'est à dire si nous ajoutions une diminution du courant de transduction en fonction de la position initiale du contact, le long de la membrane de la paramécie. Nous calculons les probabilités des trois cas avec une dépendance angulaire de la moyenne de T^* , comme suit :

$$\mu(\theta_c) = \frac{c}{90 - \theta_c} \quad (3.17)$$

où la constante c est choisie de telle sorte que la moyenne angulaire $\langle \mu(\theta_c) \rangle$ est égale à la moyenne de T^* dans le modèle uniforme (Fig. 3.14B, encart). Ici, le temps de déclenchement T^* est minimal à $\theta_c = 0^\circ$ et infini à $\theta_c = 90^\circ$. Avec ce modèle, nous constatons que les probabilités des OTAR instantanées et retardées varient considérablement avec l'angle de contact θ_c , contrairement aux observations (Fig. 3.14B, lignes pointillées rouges et bleues).

Enfin, le modèle permet une prédiction de la durée moyenne de contact des OTAR retardées en fonction de θ_c , donnée par :

$$T_2(\theta_c) = \mathbb{E}[T^* | 0 < T^* < T(\theta_c)] = \frac{\int_0^{T(\theta_c)} T^* p(T^*) dT^*}{\int_0^{T(\theta_c)} p(T^*) dT^*} \quad (3.18)$$

La prédiction est en accord quantitatif avec les observations (Fig. 3.14C, lignes bleues continues et pointillées). Ces valeurs se situent dans la plage du pic secondaire mesuré de la distribution des temps de déclenchement τ (Fig. 3.14A). Même si le temps de charge moyen est d'environ 1 s, le temps de déclenchement est en fait limité par la durée maximale de glissement contre les piliers (environ 0,3 s, Fig. 3.14C, carrés bleus).

3.3.2.4 Discussion

La nage de la paramécie ainsi que sa réponse mécanosensible ont été largement décrits dans la littérature antérieure, revue dans [55]. Le message principal de ces études est que *Paramecium* effectue une AR lors de la collision avec un obstacle, par le biais d'une réponse mécanosensible, et que cette réponse est modulée par l'emplacement de la stimulation sur la surface du nageur. Cependant, notre travail révèle une image différente du comportement de ce micro-organisme dans nos conditions expérimentales.

Tout d'abord, la collision avec un obstacle ne suscite pas nécessairement une AR. En effet, dans 90% des cas, la paramécie est déviée passivement au contact d'un pilier, effectuant un évènement que nous avons nommé SE. Dans ce cas, l'angle θ_o qui dicte l'orientation à l'issue d'une interaction de contact est imposé. A l'inverse, lorsque *Paramecium* interagit de manière hydrodynamique avec le pilier, cet angle θ_o dépend linéairement de l'angle d'entrée θ_i . En l'absence d'AR, nos résultats font directement écho à des observations précédentes sur un autre micro-organisme, la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* [93].

D'un point de vue comportemental, il est intrigant de constater que les réactions d'évitement sont relativement rares lorsque *Paramecium* rencontre de grands obstacles tels que nos piliers. Une explication possible est qu'il n'est peut-être pas essentiel pour l'organisme de réagir à un obstacle lorsqu'il peut être franchi en glissant. Cela expliquerait l'apparition de réactions retardées : une réaction d'évitement est déclenchée lorsque l'organisme est bloqué par l'obstacle pendant un certain temps. Une autre possibilité serait que la mécanosensibilité ne serve pas simplement à la navigation dans des environnements encombrés, mais aussi et peut-être surtout à l'évitement d'objets pointus susceptibles d'endommager la membrane, comme le suggèrent les récits évolutifs [100].

Un autre résultat surprenant est que de nombreuses OTARs sont retardées d'environ 150 ms, alors que les études électrophysiologiques rapportent des réponses quasi instantanées.

nées. Selon les mesures de Voltage Clamp, les courants de mécanotransduction s'activent avec une latence très courte et un temps de montée inférieur à 20 ms, chez *Paramecium* et d'autres ciliés [14]. De plus, le courant semble être transitoire. Il y a deux possibilités pour rendre nos résultats cohérents avec les études précédentes. La première est que le courant ne s'inactive que partiellement. C'est ce qui a été observé dans les canaux Piezo avec une pression appliquée constante [4]. Des études précédentes chez *Paramecium* ont quantifié le pic de courant mais pas sa valeur stationnaire. La seconde possibilité est que, lorsque l'organisme glisse le long de l'obstacle, des canaux mécanosensibles supplémentaires sont recrutés.

Enfin, une autre divergence notable avec les travaux précédents est la distribution de la mécanosensibilité le long du corps du *Paramecium*. Alors que nos données expérimentales sont en accord avec une distribution homogène de la mécanosensibilité le long de la partie antérieure de *Paramecium*, les résultats de travaux antérieurs en électrophysiologie ont montré des réponses graduelles le long de l'axe du corps [13]. La stimulation de la partie antérieure déclenche un courant entrant, porté principalement par le calcium, tandis que la stimulation de la partie postérieure déclenche un courant sortant, porté par le potassium. Au milieu, le courant de transduction disparaît. Lorsque les canaux potassiques sont bloqués pharmacologiquement, la stimulation mécanique déclenche une réponse dépolarisante uniforme dans tout le corps [96]. Ainsi, le gradient spatial de la mécanosensibilité semble être dû à l'annulation d'un courant dépolarisant mécanorécepteur spatialement uniforme par un courant hyperpolarisant spatialement gradué. Les mesures antérieures ne permettent pas de déterminer clairement si cette annulation est linéaire entre l'extrémité antérieure et l'extrémité postérieure, car compliqué par des difficultés expérimentales. En effet, les cellules immobilisées ont été stimulées mécaniquement avec une sonde en verre d'orientation fixe, et avec un mouvement fixe, tandis que la position le long de la membrane était variée. Ainsi, l'orientation et la direction par rapport à la surface de la membrane variaient, et l'amplitude de la déviation de la membrane n'était pas non plus fixe. En revanche, dans nos expériences les obstacles sont très contrôlés dans leur forme et leurs propriétés mécaniques. Par conséquent, le contact ne dépend que du propre comportement de *Paramecium*, lorsqu'elle nage contre un pilier. De plus, il n'est pas clair comment la présence de micropipettes d'électrophysiologie à l'intérieur de l'organisme et son immobilisation pourraient affecter ses propriétés mécaniques. Par exemple, la présence d'une pipette pourrait imposer une précontrainte à la surface de la cellule. En effet, dans les mécanorécepteurs artificiels avec le canal mécanosensible MscL, le mouillage de la membrane par une pipette est suffisant pour déclencher leur ouverture [23].

3.4 Influence de la vitesse de nage sur les OTAR

Pour rappel, dans tout le manuscrit (mis à part dans la section précédente 3.3.2), la fin du contact sera définie comme le dernier instant où la paramécie est dans la couronne de contact, c'est-à-dire $t_c^f \doteq \max(t | r_{min}(t) < r_c) = t_{r_c}^f$. Par ailleurs, on utilisera les définitions suivantes pour l'OTAR et le SE :

- Il y a OTAR *si et seulement si* il se produit un évènement de contact, avec une collision à t_c^i suivit d'une AR qui débute dans la couronne de contact, c'est-à-dire avec $t_{BS} \in [t_c^i; t_c^f]$.
- Il y a SE *si et seulement si* il se produit un évènement de contact et qu'aucune AR ne se produit dans toute la couronne d'interaction.

Les évènements d'interaction avec contact et pour lesquels une AR dans la couronne d'interaction mais pas dans la couronne de contact, c'est-à-dire $t_{BS} \in [t_i, t_c^i \cup] t_c^f, t_o]$, n'ont pas de qualification et ne sont pas comptabilisés dans le calcul de probabilité d'OTAR.

Nous avons vu que généralement les OTAR avaient une plus grande probabilité de se produire lorsque l'angle de collision est faible. Qu'en est-il du lien entre OTAR et vitesse de nage? On peut supposer qu'à vitesse de nage élevée, l'intensité du stimulus lors de la collision avec un obstacle est plus élevée et qu'ainsi, plus de mécanorécepteurs sont recrutés. Ainsi, l'amplitude de la dépolarisation est plus grande, ce qui augmenterait la probabilité d'OTAR. Pour quantifier cela, nous avons mesuré la probabilité d'OTAR conditionnée à la vitesse de nage $v_i \doteq v(t_i)$ à l'entrée de la paramécie dans la couronne d'interaction, à l'instant t_i , celle-ci est définie comme

$$P(OTAR|v) = \frac{\# \text{ d'OTAR avec } v_i = v \pm dv/2}{\# \text{ OTAR et } \# \text{ SE avec } v_i = v \pm dv/2} \quad (3.19)$$

où $dv = 100 \mu\text{m/s}$.

La Fig. 3.15A montre la probabilité d'OTAR conditionnée à v_i , en fonction de v_i , pour $N = 16582$ SE et OTAR, pour les réseaux carrés et aléatoires, tous Φ confondus. Les vitesses v_i sont distribuées comme montré sur la Fig. 3.15B, et autour d'une valeur moyenne $\langle v_i \rangle = 735 \pm 246 \mu\text{m/s}$ (moyenne et écart-type). Ces vitesses en entrée de la couronne d'interaction sont très proches des vitesses typiques en nage libre, autour de $800 \mu\text{m/s}$ (section 2.3 "Statistique d'une trajectoire typique"). On observe que $P(OTAR|v_i)$ diminue avec la vitesse incidente v_i . Cette observation est également conservée lorsque la vitesse considérée était $v_c \doteq v(t_c)$. Ce résultat est surprenant et contredit nos hypothèses. Toutefois, il est tout à fait possible qu'à cette échelle, la force induite par le pilier sur la membrane de la paramécie ne varie pas beaucoup avec la vitesse de nage. L'électrophysiologie peut de son côté nous apporter des réponses à cette observation. Il a été montré que

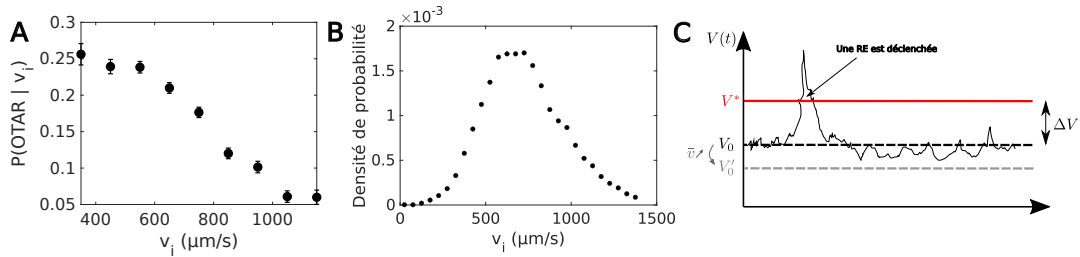


FIG. 3.15 *Dépendance de la probabilité d'OTAR en vitesse. (A) Probabilité d'OTAR étant donné la vitesse d'incidence v_i , en fonction de v_i , avec un bin de largeur $dv_i = 100 \mu\text{m/s}$ et pour $N = 16582$ évènements de collisions, tout environnements confondus. (B) Densité de probabilité de vitesse incidente v_i pour les SE uniquement. (C) Schéma de l'évolution temporelle du potentiel membranaire d'une paramécie.*

plus la membrane est hyperpolarisée, c'est-à-dire plus le potentiel membranaire est négatif, plus la vitesse de battement des cils est élevée [97, 101]. Or, si le potentiel membranaire est plus faible, l'amplitude nécessaire pour atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action sera plus grande. Le schéma donné en Fig. 3.15C illustre ce mécanisme. Les fluctuations naturelles du potentiel membranaire sont illustrées en noir, avec une valeur au repos V_0 . Dans le cas d'une cellule qui nage plus vite, son potentiel membranaire au repos sera plus bas $V'_0 < V_0$. L'amplitude ΔV grandit donc avec la vitesse de nage $v(t)$. Ainsi, lors d'un contact mécanique avec un obstacle, la dépolarisation nécessaire pour déclencher une AR sera plus grande si la paramécie nage plus vite. Ainsi, suivant notre approche, la vitesse de nage reflète à la fois la déformation de la membrane à travers un transfert d'énergie mécanique au contact, et une mesure de l'excitabilité à travers le lien entre fréquence de battement des cils et hyperpolarisation. Toutefois, nous n'avons pas de méthode pour distinguer indépendamment les deux effets et quantifier leur importance relative. Nos résultats expérimentaux (Fig. 3.15A) suggèrent toutefois que le second effet domine le premier et que le comportement de la paramécie au contact est principalement régulée par ses dynamiques bioélectriques et biochimiques internes (concentration de calcium dans les cils, hyperpolarisation etc.).

3.5 Influence du rayon de courbure sur les OTAR

Un organisme mécanosensible naviguant dans un environnement écologiquement pertinent réagit-il de la même façon lorsqu'il rencontre différents types d'obstacles? Des résultats expérimentaux [13] suggèrent que la distribution de la réponse mécanosensible

n'est pas uniforme le long de *Paramecium* mais est graduée, avec une réponse maximale sur l'extrémité antérieure et qui s'annule au milieu. Il est possible que cette inhomogénéité des réponses existe pour permettre à la paramécie de réagir de manière différenciée à une diversité de d'obstacles : un mur plan activera un plus grand nombre de mécanorécepteurs qu'un petit obstacle lors d'une interaction de contact avec la partie antérieure de la paramécie, ce qui induit une AR avec une plus grande probabilité. Ce type de mécanisme peut exister pour éviter que la paramécie se retrouve piégée lors de sa navigation dans des environnements complexes, comme cela a été étudié chez d'autres microorganismes [102, 103, 104, 105].

Nous avons voulu étudier cette question en faisant varier le rayon de courbure des obstacles r_p . Les piscines à obstacles ont été fabriquées de la même manière que décrite en section 3.1.1, avec des outils de taille différente pour le forage et le fraisage des obstacles. La Fig. 3.16A montre des images en champ sombre des piscines à différents r_p . Les environnements à $r_p = 63,5 \mu\text{m}$, $r_p = 142,5 \mu\text{m}$ et $r_p = 254 \mu\text{m}$ sont construits à nombre d'obstacles par piscine $N_p = 145$ constant, en gardant fixée la taille de la piscine (côté de longueur 30 mm) et en laissant ainsi varier la fraction de surface Φ . Dans le cas $r_p = 987.5 \mu\text{m}$, le nombre d'obstacles vaut $N_p = 50$ pour une piscine de même taille. Le rayon des obstacles est mesuré grâce à la méthode décrite en section 3.1.4, en calculant la distribution des distances minimales r_{min}^* lors d'une interaction entre une paramécie et un pilier. Les valeurs obtenues, et qui seront utilisées par la suite sont données dans le tableau 3.2. La Fig. 3.16B montre $P(r_{min}^* = r)$ en fonction de la distance à la surface du pilier $r - r^*$, où $r^* = r_p + b$ est le rayon du volume exclu, pour les 4 environnements différents. On observe que les deux régimes de contact et de non contact mis en évidence en section 3.1.4 se superposent et que les distributions du régime de contact sont de même largeur quelque soit r_p . Cela confirme bien que l'amplitude des fluctuations de r_{min}^* sur le régime de contact est plus liée aux fluctuations aléatoires de l'ajustement elliptique de la paramécie qu'à la taille du pilier considéré.

Le tableau 3.2 résume les principales statistiques issues de l'analyse de données sur les expériences à r_p varié.

En guise de contrôle, nous avons mesuré les vitesses moyennes par trajectoire \bar{v} et calculé les boîtes à moustaches (boxplot) de ces vitesses pour chaque condition (c'est-à-dire à r_p fixé). On peut observer sur la Fig. 3.16C que les boîtes se superposent toutes, avec une moyenne entre 500 $\mu\text{m/s}$ et 600 $\mu\text{m/s}$. Nous avons également calculé pour chaque expérience, la fréquence d'AR, selon la formule

$$f_{AR} = \frac{N_{AR}}{T_{obs}} \quad (3.20)$$

où N_{AR} et T_{obs} sont respectivement le nombre total de REs et le temps d'observation

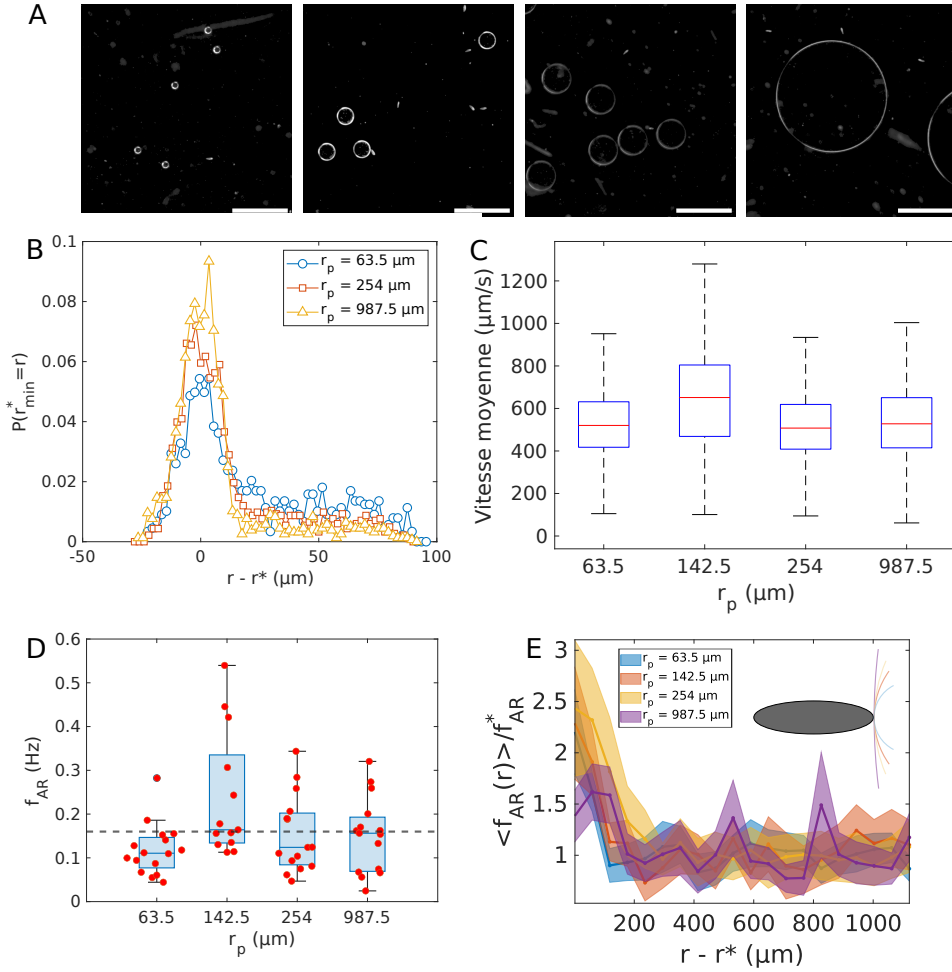


FIG. 3.16 Influence du rayon de courbure sur les OTAR. (A) Images en champ sombre des environnements à r_p varié, respectivement avec $r_p = 63,5 \mu\text{m}$, $r_p = 142,5 \mu\text{m}$, $r_p = 254 \mu\text{m}$ et $r_p = 987,5 \mu\text{m}$ (de gauche à droite). La barre d'échelle est de 1 mm de long. (B) Probabilité $P(r_{\min}^* = r)$ en fonction de $r - r^*$ où $r^* = r_p + b$ est le rayon du volume exclu, et pour différentes valeurs de r_p . (C) Boxplot des vitesses moyennes par trajectoire \bar{v} pour toutes les trajectoires regroupées par environnement à r_p fixé. (D) Boxplot des fréquences de AR par expérience, où f_{AR} est calculé pour chaque expérience selon l'équation 3.20. La ligne en pointillée représente la fréquence moyenne de REs en nage libre, $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle$. (E) Fréquence moyenne de AR $\langle f_{AR}(r) \rangle$ à une distance $r - r^*$ de la surface d'un pilier, normalisée par la fréquence typique de AR loin d'un obstacle f_{AR}^* , obtenue en moyennant $\langle f_{AR}(r - r^* > 200 \mu\text{m}) \rangle$. Par ordre de r_p croissant, f_{AR}^* vaut respectivement 0,116 (bleu), 0,247 (rouge), 0,142 (orange) et 0,140 (violet) Hz. Encart : schéma à l'échelle d'une paramécie en collision frontale avec des piliers de rayons différents.

r_p (μm)	Φ	M	T_{obs} (min)	N_{AR}	N_c
63,5	0,0013	16	686	5120	465
142,5	0,01	13	202	2405	278
254	0,030	15	690	5891	1313
987,5	0,16	15	495	4692	1017

TABLE 3.2 – Principales données d’analyse pour les expériences à r_p varié. On notera r_p le rayon du pilier (en microns), Φ la fraction de surface, M le nombre d’expérience par condition, T_{obs} le temps total d’observation des trajectoires (en minutes) pour toutes les expériences correspondant à une condition donnée, N_{AR} le nombre total de AR et N_c le nombre total d’évènements de contact.

total des trajectoires pour une expérience donnée. Cela nous permet de calculer les boîtes à moustaches de la fréquence des AR pour chaque condition, montrée en Fig. 3.16D. Nous observons cette fois-ci quelques variations, à la fois entre les expériences et entre les conditions, bien que celles-ci restent faibles. Si l’on compare la fréquence moyenne de AR en nage libre, donnée par $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle = 0.165 \pm 0.0567$ Hz (moyenne et écart-type) avec les fréquences moyennes de AR pour chaque condition, on n’observe pas de effet significatif. Ces deux résultats sur la vitesse de nage et la fréquence de AR montrent qu’il y a de faibles variations comportementales entre les différentes expériences, et permettent d’assurer la reproductibilité des expériences.

Enfin, nous avons étudié l’influence des obstacles à r_p varié sur la mécanosensibilité des paramécies. Pour cela, nous avons calculé la fréquence moyenne d’AR $\langle f_{AR}(r) \rangle$ à une distance $r - r^*$ de la surface d’un pilier, normalisée par la fréquence typique d’AR loin d’un obstacle f_{AR}^* , obtenue en moyennant $\langle f_{AR}(r - r^* > 200 \mu\text{m}) \rangle$. Par ordre de r_p croissant, f_{AR}^* vaut respectivement 0,116, 0,247, 0,142 et 0,140 Hz, en accord avec la fréquence moyenne d’AR en nage libre. Proche d’un pilier, pour $r - r^* < 100 \mu\text{m}$, on observe sur la Fig. 3.16E une hausse de la fréquence d’AR normalisée d’un facteur 2-3 pour les 3 plus faibles r_p . On retrouve la signature de la mécanosensibilité mise en évidence en section 3.3.1. On remarque également que la fréquence moyenne d’AR normalisée pour $r - r^* < 100 \mu\text{m}$ (qu’on peut également interpréter comme une probabilité d’OTAR) augmente avec r_p (courbes continues bleue, rouge et orange par ordre de r_p croissant), avec toutefois une superposition des barres d’erreur (erreur standard à la moyenne, régions bleue, rouge et orange). De manière surprenante et contre-intuitive, ces résultats ne sont pas observés à $r_p = 987,5 \mu\text{m}$, assimilable à un plan infini (encart de la Fig. 3.16E) où la fréquence d’AR normalisée proche du pilier n’est pas significativement différente de celle

loin du pilier. Nous n'avons pas d'explication à cette absence de réaction mécanosensible pour cette valeur de r_p .

Pour conclure, nous avons vérifié la présence d'AR mécanosensibles proches d'un pilier pour les environnements à $r_p = 63, 5, 142,5$ et $254 \mu\text{m}$ alors que l'environnement à $r_p = 987,5 \mu\text{m}$ ne semblait pas induire d'OTARs chez les paramécies. Nous observons une augmentation de la probabilité d'OTAR avec le rayon r_p des obstacles (sauf pour $r_p = 987,5 \mu\text{m}$). Cela signifie qu'à interaction de contact fixée, la probabilité qu'ait lieu une AR induite par la mécanosensibilité augmente avec la surface de contact entre la paramécie et le pilier. Ce résultat va dans le sens de Ogura *et al.* [13]. Cet effet était toutefois faible, ce qu'on peut comprendre par la faible plage de variation du rayon de courbure. Il serait par exemple intéressant d'observer le comportement mécanosensible d'une paramécie sur un pilier de rayon bien inférieur à sa largeur (par exemple avec $r_p = 10 \mu\text{m}$), ce qui est beaucoup plus difficile à réaliser avec des piliers en PDMS en conservant le même rapport d'aspect ($h = 340 \mu\text{m}$). De plus, pour mieux quantifier les interactions de contact entre la surface d'une paramécie et un pilier, il serait nécessaire de prendre en compte les propriétés mécaniques de la membrane, le couplage entre la membrane et les cils, l'épaisseur de la couche de cils, etc., ce qui n'est pas possible avec le dispositif expérimental actuel.

3.6 Corrélations temporelles

Nous avons ainsi vu que la paramécie était sensible localement à son environnement, et qu'en particulier l'angle de collision, la vitesse d'incidence et dans une moindre mesure, la courbure de l'obstacle, impactaient sa réponse mécanosensible. Comment ces événements se corrèlent-ils sur des temps plus longs ? Est-ce que la paramécie intègre l'histoire des événements passés pour moduler sa réponse mécanosensible ?

Il existe une importante littérature sur l'apprentissage chez *Paramecium* [55]. Il est toutefois difficile d'en tirer des conclusions claires tant le sujet est complexe et vaste, mais également par le fait qu'un certain nombre d'études manquent de contrôles et d'observations appropriés [106]. Certains de ces résultats peuvent être classés comme de l'adaptation, et une manifestation de ce phénomène a été mise en évidence dans la section 2.1.6 de ce manuscrit. Les effets de mémoire existent également chez d'autres micro-organismes comme *Tetrahymena*, une cousine de *Paramecium* qui, confinée dans des gouttes d'eau pendant quelques instants, poursuit les trajectoires circulaires une fois relâchée dans un plus grand espace. Le diamètre et la durée des trajectoires circulaires reflète la taille des gouttes et la durée de confinement des cellules dans celles-ci [107]. Enfin, il a également été montré par Kunita *et al.* [108] que lorsqu'une paramécie nage dans un capillaire long, suf-

fisamment étroit pour l'empêcher de se retourner, et fermé aux extrémités par de l'huile, elle produit des AR à répétition. Au bout d'environ une minute, la distance parcourue pendant la nage arrière augmente, comme une tentative de s'échapper du capillaire. D'une manière similaire, nous avons voulu comprendre comment, dans notre système expérimental, la réponse d'une paramécie était modulée par l'histoire des collisions précédentes.

3.6.1 Habituation

Pour quantifier cet effet, nous nous sommes intéressés à $P(OTAR|\tau_c^i)$ en fonction de τ_c^i , *i.e.* à la probabilité qu'une collision à un temps t_c^i donne lieu à une OTAR étant donnée la durée τ_c^i entre cette collision à t_c^i et la collision précédente à t_c^{i-1} (Fig. 3.17A). On peut observer sur la Fig. 3.17B que la probabilité de faire une OTAR diminue plus la collision précédente est récente, jusqu'à un facteur 2. Au delà d'un certain temps (environ 2 s), cette probabilité devient constante autour d'une valeur de 0,2 et la réponse mécanosensible de la paramécie ne semble plus impactée par son histoire. Ce résultat est un signe clair d'un phénomène d'habituation, une des formes les plus élémentaires de mémoire [109], défini par Thomson et Spencer [110] comme "l'application répétée d'un stimulus [qui] résulte dans la diminution progressive d'un paramètre de la réponse jusqu'à un niveau asymptotique. Ce changement peut inclure des diminutions de la fréquence et/ou de l'amplitude de la réponse" (traduction). Nous avons ensuite voulu déterminer la portée temporelle de tels effets. Pour cela, nous avons divisé la population en deux, entre les triplets de collisions successives pour lesquelles les collisions d'ordre $i - 1$ et $i - 2$ sont "rapprochées" dans le temps ($\tau_c^{i-1} < 0,8$ s) et "éloignées" ($\tau_c^{i-1} > 0,8$ s). Nous pouvons observer sur la Fig. 3.17C que lorsque τ_c^{i-1} est petit (courbe bleue), la réponse mécanosensible $P(OTAR|\tau_c^i)$ est plus faible qu'à grand τ_c^{i-1} . Cela indique que la réponse mécanosensible de la paramécie n'est pas seulement modulée par la durée la séparant de la collision antérieure, mais dépend aussi de celle d'avant, au moins. On peut également observer que la durée à laquelle le régime de probabilité constante survient est la même, ainsi que la valeur de cette probabilité sur ce régime (autour de 0,2). Ces deux résultats suggèrent l'existence d'un temps caractéristique sous-jacent, qui régit les effets de mémoire chez la paramécie.

Nous avons vu que la paramécie n'était pas dans le même état selon le stimulus, ce qui suggère l'existence de variables internes cachées. Pour comprendre cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Steven Block, Jeffrey Segall et Howard Berg dans lesquels des bactéries *Escherichia coli* attachées à une surface par l'une de leurs flagelles sont exposées brièvement à un attractant chimique, et y répondent en inversant la rotation de leur flagelle pendant un certain laps de temps [111, 112]. En mesurant la fonction de réponse

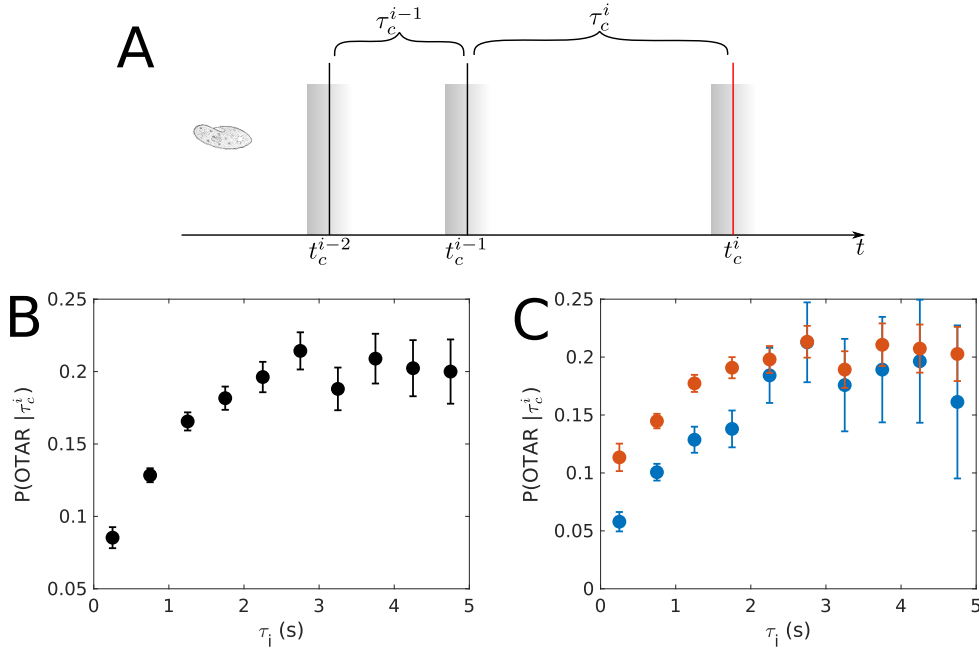


FIG. 3.17 Effets d'habituations. (A) Schéma des paramètres pour l'étude de l'habituation. Une paramécie collisionne avec des piliers en PDMS (cylindres gris) aux instants t_c^{i-2} , t_c^{i-1} et t_c^i (lignes noires verticales). On s'intéresse à la probabilité que la collision à t_c^i donne lieu à une OTAR. (B) Probabilité d'OTAR conditionnée à la durée τ_c^i , pour tous τ_c^{i-1} et pour $N = 18142$ événements de collisions précédées d'au moins 2 autres collisions. Les données proviennent d'environnements à toutes topologies et Φ confondus. (C) Probabilité d'OTAR conditionnée à la durée τ_c^i , pour $\tau_c^{i-1} < 0,8$ s (bleu, $N = 4634$) et pour $\tau_c^{i-1} > 0,8$ s (rouge, $N = 13676$).

à cette impulsion chimique, comme la probabilité d'inverser la direction de rotation en fonction du temps, ils ont montré que la bactérie présentait une sorte de "mémoire". Elle intègre les stimuli qui se sont produits au cours des dernières secondes pour déterminer son comportement présent (sens de rotation des flagelles), avec une fonction de réponse impulsionnelle qui présente des propriétés de filtre passe-bande [112, 111]. Mesurer la fonction de réponse est utile car cela permet en pratique de prédire la réponse de la bactérie à un stimulus arbitraire, en sommant la suite correspondante de réponses impulsionnelles. Cette prédiction fonctionne uniquement si le système est linéaire, c'est-à-dire qu'il ne présente pas d'effet de seuil et que le stimulus ne sature pas la réponse. Cela était effectivement le cas dans les expériences de chimiotaxie sur *Escherichia coli*, tant qu'il n'y avait pas une saturation des récepteurs [113, 114]. Ainsi, nous avons voulu alors comprendre si la réponse mécanosensible à un ensemble de stimuli mécaniques chez la pa-

ramécie était assimilable à la fonction de réponse à une force externe, comme un stimulus chimique. Plus spécifiquement, est-ce que la paramécie se comporte comme un système linéaire en fonction de son histoire ?

Nous avons tout d'abord défini une fonction de réponse comme $C(\tau_c^i) = 1 - P(OTAR|\tau_c^i) - P_0$, où $P_0 = 0,20$ est la valeur du plateau à probabilité constante, obtenue en moyennant $P(OTAR|\tau_c^i)$ pour $\tau_c^i > 2,0$ s. Cette fonction est calculée pour tous les évènements de collisions ayant au moins 2 autres collisions dans le passé, moyenné sur tous ces évènements, avec tous les environnements à obstacles confondus. La courbe est bien ajustée (courbe rouge, Fig. 3.18, $R^2 = 0,95$) par une exponentielle décroissante :

$$C(\tau_c^i) = Ae^{-\tau_c^i/\tau^*} \quad (3.21)$$

avec $A = 0,16$ et $\tau^* = 0,79 \pm 0,26$ s (intervalle de confiance à 95%) le temps caractéristique de réponse.

Nous formulons ensuite deux hypothèses. La première hypothèse est l'hypothèse de linéarité qui stipule que la réponse du système est linéaire si l'égalité suivante est vérifiée : $C(t|hist) = \int_{-\infty}^t C_{imp}(t-\tau)S(\tau)d\tau$ où $S(\tau) = \sum_{t_c^i} \delta(t_c^i - \tau)$ donne l'histoire du système, $C(t|hist)$ est la réponse du système à t pour une histoire quelconque, c'est à dire pour une séquence de collisions à différents instants, et $C_{imp}(t-\tau)$ est la réponse impulsionnelle du système au temps t à une unique stimulation au temps τ .

Étant donné que la réponse impulsionnelle $C_{imp}(t-\tau)$ suppose une histoire totalement vierge, elle est inaccessible dans notre cas, et nous faisons l'hypothèse de travail suivante.

La réponse du système à une stimulation à un instant donné peut être assimilée à la réponse du système moyennée sur toutes les histoires, ce à quoi nous avons accès, avec $\langle C(t|hist) \rangle_{hist} \propto C_{imp}(t-\tau)$.

En pratique, puisque que l'histoire accessible du système se résume aux deux collisions précédant t_i et que $\langle C(\tau_c^i) \rangle = Ae^{-\tau_c^i/\tau^*}$ (Fig. 3.18A, courbe rouge), nous pouvons exprimer les deux hypothèses sous la forme :

$$C(\tau_c^i; \tau_c^{i-1}) = Ae^{-\tau_c^i/\tau^*} + Ae^{-(\tau_c^i + \tau_c^{i-1})/\tau^*}. \quad (3.22)$$

où $C(\tau_c^i; \tau_c^{i-1})$ est la fonction de réponse du système pour une histoire donnée, ayant une durée fixe τ_c^i entre les collisions d'indices i et $i-1$ et une durée fixe τ_c^{i-1} entre les collisions d'indices $i-1$ et $i-2$.

Pour vérifier cette hypothèse, on fixe τ_c^{i-1} dans un certain intervalle, on calcule d'une part $\langle C(\tau_c^i; \tau_c^{i-1}) \rangle$ et d'autre part $Ae^{-\tau_c^i/\tau^*} + Ae^{-(\tau_c^i + \tau_c^{i-1})/\tau^*}$ et on teste l'égalité en fonction de τ_c^i .

Les Fig. 3.18C-F montrent les résultats pour différents τ_c^{i-1} marqués en couleur sur la Fig. 3.18B. Nous observons une superposition entre les courbes, ce qui semble vérifier l'égalité de l'Eq. 3.22. Ces premiers résultats semblent indiquer que la réponse d'une

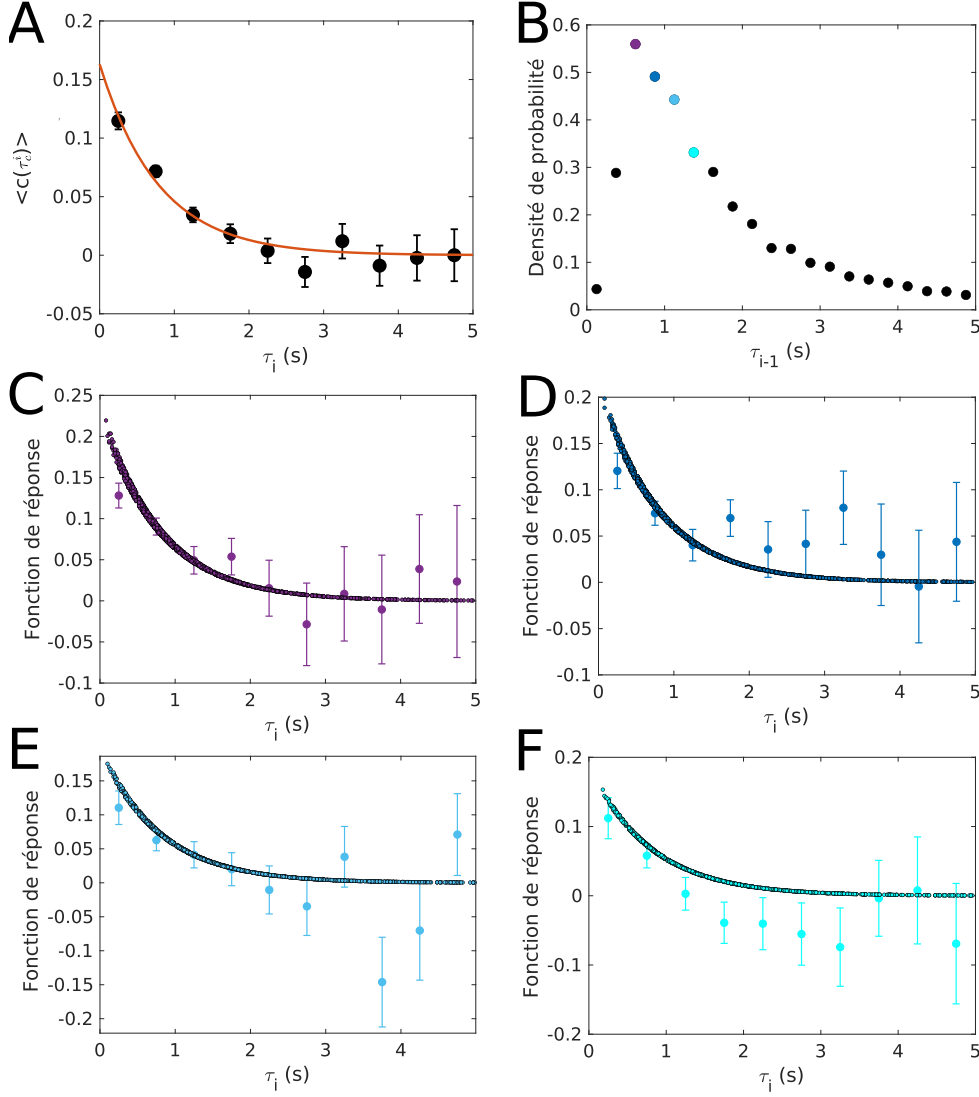


FIG. 3.18 Modélisation de l'habituation. (A) Fonction de réponse expérimentale moyenne $\langle c(\tau_c^i) \rangle$ avec une largeur de bin de 0,5 ms pour tous τ_c^{i-1} , ajustée par une fonction exponentielle $C(\tau_c^i) = A \exp -\tau_c^i/\tau^*$, avec $A = 0,16$ et $\tau^* = 0,79$ s ($R^2 = 0,95$). (B) Densité de probabilité des temps entre collisions successives τ_c^i . (C-F) Fonction de réponse $\langle C(\tau_c^i; \tau_c^{i-1}) \rangle$ et $Ae^{-\tau_c^i/\tau^*} + Ae^{-(\tau_c^i + \tau_c^{i-1})/\tau^*}$ en fonction de τ_c^i pour $\tau_c^{i-1} \in [0, 5; 0, 75]$ (violet), $\tau_c^{i-1} \in [0, 75; 0, 1]$ (bleu foncé), $\tau_c^{i-1} \in [1, 0; 1, 25]$ (bleu clair), $\tau_c^{i-1} \in [1, 25; 1, 50]$ (cyan).

paramécie à une séquence de collisions avec des piliers peut être modélisée par un processus linéaire. Cela suggère qu'il existe une superposition linéaire des réponses à une stimulation donnée. Par opposition, dans certains processus non-linéaires, le système est totalement réinitialisé à chaque stimulation, qu'importe la stimulation et l'histoire passée des évènements.

3.6.2 Sensibilisation

Nous avons vu que l'histoire des collisions précédentes modulait la probabilité d'OTAR sous un phénomène nommé habituation. Qu'en est-il de l'histoire des AR (OTAR et SAR confondues) ?

Pour quantifier cela, nous avons calculé $P(OTAR|\tau_{AR}^i)$, la probabilité d'OTAR conditionnée à la durée τ_{AR}^i entre la collision à t_c^i et l'AR précédente (OTAR et SAR confondues) à t_{AR}^{i-1} , comme schématisé en Fig. 3.19A. Le calcul est effectué sur $N = 34058$ évènements de collision précédés d'au moins une AR et pour des paramécies évoluant dans des environnements à toutes topologie d'obstacles (carré ou aléatoire) et fraction de surface (Φ) confondues. On observe sur la Fig. 3.19B qu'à temps court, $\tau_{AR}^i \lesssim 0,5$ s, $P(OTAR|\tau_{AR}^i)$ décroît linéairement avec τ_{AR}^i avec un coefficient directeur de $-1,27$ s (courbe rouge, ajustement linéaire avec $R^2 = 0,92$) et est constante au-delà, avec une probabilité moyenne de $\langle p \rangle = 0,39$. Le temps de transition entre ces deux régimes vaut $\tilde{\tau}_{AR}^i = 0,532$ s et est déterminé grâce à l'ajustement des courbes.

On comprend donc qu'en dessous d'un certain temps, la récence d'une AR est corrélée avec la probabilité d'en faire une autre. Toutefois, au dessus d'un temps caractéristique $\tilde{\tau}_{AR}^i = 0,532$ s, la mémoire des AR précédente est perdue, et la probabilité de faire une OTAR est indépendante de la durée depuis la dernière AR. On appellera ce phénomène *sensibilisation*, défini comme l'augmentation dans l'intensité de la réponse (mécanosensible dans notre cas) sous stimulations répétées, et on peut l'interpréter d'un point de vue électrophysiologique. Quand une AR est déclenchée, le potentiel membranaire est à son niveau le plus haut. Entre cet instant là et avant que les pompes ioniques (et autres mécanismes actifs ou passifs) expulsent le calcium intracellulaire et que le potentiel revienne à son niveau d'équilibre, il est alors plus probable qu'une petite fluctuation dans le potentiel membranaire déclenche à nouveau un potentiel d'action et provoque une AR.

La sensibilisation est un type de modification comportementale bien connu en neurosciences et déjà identifié chez certains ciliés, comme *Spirostomum* [115]. D'un point de vue évolutif, la répétition d'un stimulus peut être perçue par l'organisme comme une tentative d'attaque, et l'augmentation de sa réponse à cela peut être interprétée comme une réaction d'alerte de l'organisme.

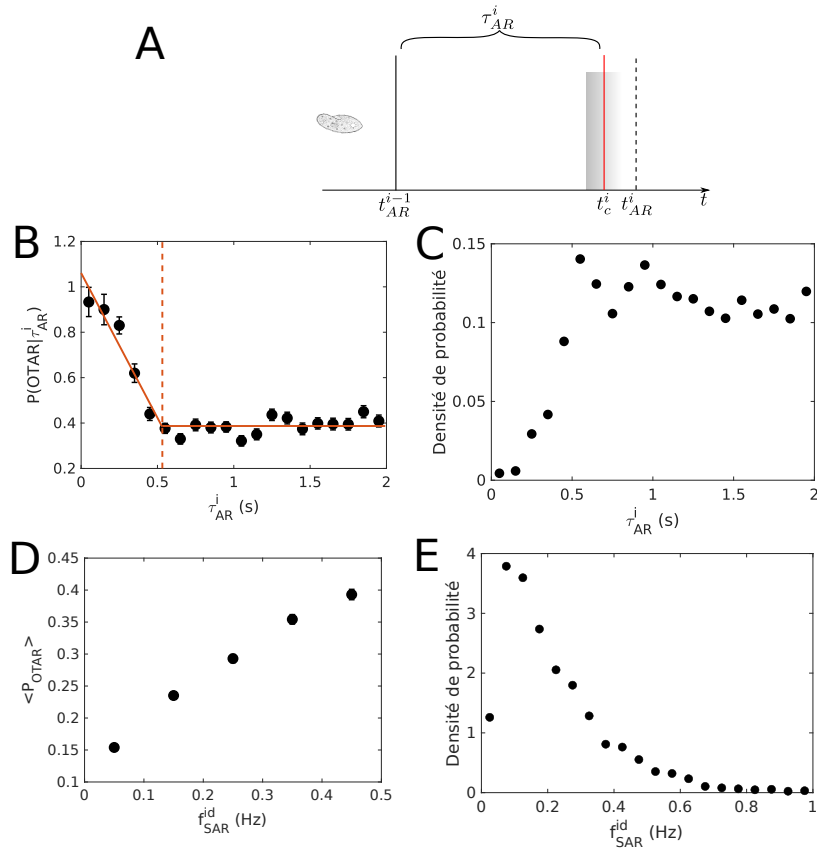


FIG. 3.19 Effets de sensibilisation et d'excitabilité. (A) Schéma des paramètres utilisés pour l'étude de la sensibilisation. Une paramécie entre en contact avec un pilier (cylindre gris) à t_c^i et déclenche une OTAR à t_{AR}^i avec une probabilité $P(OTAR|\tau_{AR}^i)$, i.e. la probabilité d'effectuer une OTAR conditionnée à la durée τ_{AR}^i entre la collision à t_c^i et l'AR qui la précède à t_{AR}^{i-1} . (B) Probabilité $P(OTAR|\tau_{AR}^i)$ en fonction de τ_{AR}^i , pour une largeur de bin de 100 ms. La probabilité est calculée à partir de $N = 34058$ événements de collision précédés d'au moins une AR et pour des paramécies évoluant dans des environnements à toutes topologies (carré ou aléatoire) et fraction de surface (Φ) confondus. La courbe est ajustée par une fonction affine sur $[0; 0,5]$ s (courbe rouge) et donne $f(\tau_{AR}^i) = -1,267\tau_{AR}^i + 1,061$ ($R^2 = 0,92$). Pour $\tau_{AR}^i > 0,5$ s, la courbe est modélisée par une constante (courbe rouge), en calculant la valeur moyenne sur cette intervalle de temps, qui vaut 0,387. L'intersection de ces deux régimes est représenté par une ligne pointillée rouge à $\tau_{AR}^i = 0,532$ s. (C) Densité de probabilité de τ_{AR}^i pour une largeur de bin de 100 ms. (D) Probabilité d'OTAR par trajectoire $\langle P_{OTAR} \rangle$ en fonction de la fréquence de SAR par trajectoire f_{SAR}^{id} , moyenné sur $N = 2492$ trajectoires présentant au moins une collision et au moins une SAR, pour une largeur de bin de 0,1 Hz. (E) Densité de probabilité de la fréquence de SAR par trajectoire, pour une largeur de bin de 50 ms.

Malgré cela, l'existence de la sensibilisation chez *Paramecium tetraurelia* à travers nos mesures est à nuancer de par la présence potentielle d'artefacts statistiques. En effet, à l'échelle de la population, pour un nombre de collision donné, une cellule plus excitable, c'est-à-dire déclenchant plus fréquemment des AR, aura plus de chance de déclencher des OTAR (voir section 3.6.3), tout en ayant plus de chance d'avoir τ_{AR^i} petit. On s'attend donc à avoir une anti-corrélation entre $P(OTAR|\tau_{AR^i})$ et τ_{AR^i} . A l'échelle de la cellule, il n'est pas clair comment l'excitabilité fluctue et peut biaiser les effets mesurés de sensibilisation. Savoir plus clairement si la sensibilisation chez la paramécie est un effet réel ou bien un artefact demanderait par exemple des expériences comportementales en suivi automatisé où la paramécie est imagée sur des temps longs, permettant de corrélérer des mesures de collisions à des mesures d'excitabilité, à l'échelle du même organisme.

3.6.3 Excitabilité

Comment la mécanosensibilité d'une paramécie est couplée à son excitabilité, que l'on modélise par son taux de réponses spontanées, en l'absence de stimulations extérieures. L'excitabilité peut être quantifiée par la fréquence de SAR, c'est-à-dire la fréquence des AR se produisant loin d'un obstacle, en pratique en dehors de la couronne de contact.

Nous avons calculé à l'échelle d'une trajectoire, la probabilité d'OTAR comme

$$P(OTAR) = \frac{n_{OTAR}^{id}}{n_{SE}^{id} + n_{OTAR}^{id}} \quad (3.23)$$

où n_{OTAR}^{id} et n_{SE}^{id} sont respectivement le nombre d'OTAR et le nombre de SE pour une trajectoire id donnée. De la même manière, nous avons calculé

$$f_{SAR}^{id} = \frac{n_{SAR}^{id}}{T_{obs}^{id}} \quad (3.24)$$

où n_{SAR}^{id} est le nombre de SAR au cours de la trajectoire id et T_{obs}^{id} sa durée. Nous avons exclu les trajectoires sans collision et sans SAR. En moyennant $P(OTAR)$ sur $N = 2492$ trajectoires, et en binnant ses valeurs en fonction de f_{SAR}^{id} , on peut observer sur la Fig. 3.19D que les deux quantités sont corrélées. Plus une paramécie a tendance à déclencher fréquemment des SAR, c'est-à-dire à être excitable (haut potentiel membranaire au repos), plus elle fait d'OTAR, c'est-à-dire que sa réponse mécanosensible est d'autant plus exacerbée.

3.6.4 Conclusion

Nous avons mis en évidence plusieurs phénomènes de mémoire chez la paramécie. L'habituation correspond à la diminution de la réponse mécanosensible lorsque les stimu-

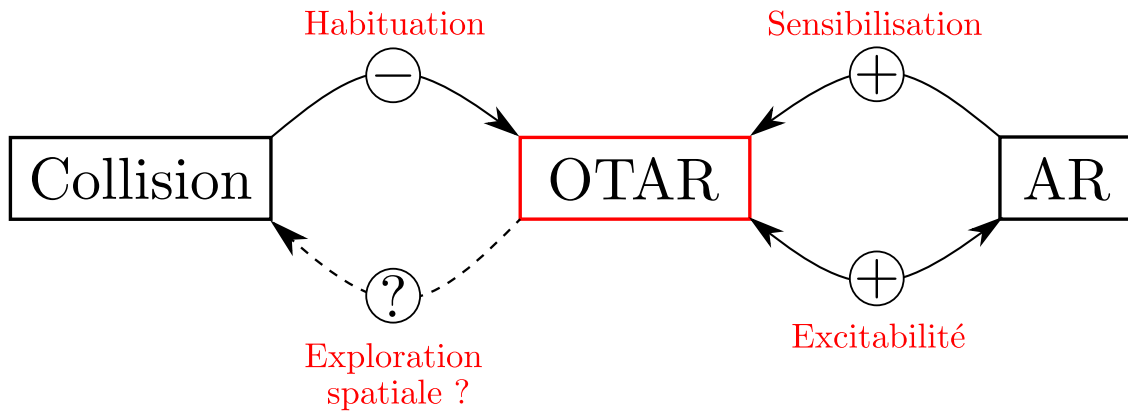


FIG. 3.20 Schéma des boucles de rétroaction qui modulent positivement ou négativement les réactions mécanosensibles chez la paramécie.

lations mécaniques sont rapprochées dans le temps. La sensibilisation correspond à l'augmentation de la réponse mécanosensible lorsque les AR sont rapprochées dans le temps. L'excitabilité correspond au lien entre la réponse mécanosensible et le niveau d'excitation d'une cellule, qu'on assimile à son taux de SAR. Ces effets modulent ainsi positivement ou négativement la probabilité d'OTAR, comme schématisé sur la Fig. 3.20. Toutefois, le rôle de ces effets dans l'exploration spatiale d'environnements complexe reste à comprendre. Également, qu'est-ce que la mécanosensibilité apporte vis-à-vis de l'évitement des obstacles par la paramécie, et sa capacité à ne pas se faire piéger ? Nous étudierons ces différents aspects dans le Chapitre 4.

Chapitre 4

Contents

4.1 Matériels et méthodes	104
4.2 Résultats	115

Le comportement de particules actives dans des environnements complexes fait déjà l'objet de nombreux travaux [116]. En particulier, Brun-Cosme-Bruny *et al.* ont étudié le comportement de la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* dans des réseaux de piliers et ont montré que le coefficient de diffusion effectif diminuait avec la densité de piliers [117].

Comment ce résultat est-il modifié dans le cas d'un organisme mécanosensible, la paramécie, qui présente une réaction bien marquée lors d'une collision avec un obstacle ? Comment la mécanosensibilité impacte-t-elle l'exploration spatiale de la paramécie dans des environnements à distribution spatiale régulière et aléatoire d'obstacles, en fonction de la fraction de surface des obstacles ?

Le coefficient de diffusion est une mesure pertinente de l'exploration spatiale à temps long. Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment (voir section 2.4), le système expérimental actuel ne nous permet pas d'effectuer une mesure de diffusivité chez la paramécie, à cause d'une part de l'apparition de mouvements circulaires qui biaisent les trajectoires typiques "run-and-tumble" et d'autre part de la faible longueur des trajectoires. Nous nous sommes alors appuyés sur des mesures expérimentales d'observables macroscopiques pertinentes ainsi que sur des simulations numériques de trajectoires de paramécies construites à partir des données expérimentales. Cela nous a permis de comparer des prédictions à nos mesures expérimentales.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Simulations numériques

Dans le cadre d'une collaboration avec Thibault Bertrand du Département de Mathématiques à l'Imperial College London et deux de ses étudiants, Deepti Kannan et Henry Alston, des simulations numériques ont été développées.

La paramécie est modélisée par une particule brownienne active (ABP) ponctuelle, dont le mouvement est modélisé avec une équation de Langevin en deux dimensions. Etant donné que la paramécie nage à bas nombre de Reynolds ($\text{Re} \simeq 0,1$ [118]), le terme inertiel peut être négligé devant le terme frictionnel (régime amorti). Ainsi, l'évolution de la position du centre de masse \mathbf{r} et de l'orientation θ (par rapport à l'horizontale) d'une ABP ponctuelle sphérique dans le régime amorti est décrite par les équations différentielles suivantes,

$$\dot{\mathbf{r}} = \beta D_T \mathbf{F}(\mathbf{r}) + \sqrt{2D_T} \boldsymbol{\eta}_T(t) \quad (4.1)$$

$$\dot{\theta} = \sqrt{2D_R} \eta_R(t) \quad (4.2)$$

où $\beta = 1/(kT)$ est la température inverse et la vitesse de translation de la particule $\dot{\mathbf{r}}$ est donnée par la somme de deux termes, la force totale \mathbf{F} exercée sur la particule composée d'une force externe et d'une force d'auto-propulsion et un vecteur à bruit gaussien $\boldsymbol{\eta}_T(t)$ de moyenne nulle et de matrice de corrélation $\langle \eta_i(t) \eta_j(t') \rangle = \delta_{ij} \delta(t - t')$. Similairement, la vitesse de rotation $\dot{\theta}$ est égale à une variable aléatoire gaussienne $\eta_R(t)$ de moyenne nulle et de variance l'unité. Les termes de bruit translationnel et rotationnel prennent en compte les fluctuations aléatoires dans le mouvement de translation et de rotation du microorganisme et l'intensité de ces fluctuations est quantifiée par les coefficients de diffusion translationnel D_T et rotationnel D_R . Le caractère "actif" de ces particules browniennes est lié à l'existence d'une force d'auto-propulsion $F_p \hat{\mathbf{u}}$ qui entraîne la particule dans la direction du mouvement, définie par le vecteur $\hat{\mathbf{u}} = [\cos \theta, \sin \theta]$. En l'absence de forces externes, une ABP évolue à la vitesse d'autopropulsion $v_p = \beta D_T F_p$ dans la direction de son orientation θ . Ainsi, la particule possède un mouvement persistant avant de "randomiser" sa direction avec une longueur de persistance donnée par $L_p = v_p / D_R$.

En l'absence de forces externes, le déplacement quadratique moyen (MSD) d'une ABP sphérique est donné par [119] :

$$MSD(\Delta t) = 4D_T \Delta t + 2 \left(\beta F_p \frac{D_T}{D_R} \right)^2 [D_R \Delta t + e^{-D_R \Delta t} - 1] \quad (4.3)$$

où Δt est le pas de temps. Cette expression prend la forme

$$MSD(\Delta t) = \begin{cases} 4D_T\Delta t + v_p^2\Delta t^2 & \text{pour } \Delta t \ll \tau_R \\ (4D_T + v_p^2\tau_R)\Delta t & \text{pour } \Delta t \gg \tau_R \end{cases} \quad (4.4)$$

où $\tau_R = D_R^{-1}$ est l'échelle de temps qui contrôle les transitions entre les différents régimes. A des échelles de temps courtes, $\Delta t \ll \tau_R$, à cause des fluctuations aléatoires de position et d'orientation, l'ABP est soumise à un mouvement Brownien caractérisé par un coefficient de diffusion D_T . A des échelles de temps intermédiaires, $\Delta t \simeq \tau_R$, le mouvement est balistique à cause de la persistance de la direction de mouvement, et la particule avance à vitesse v_p . Aux échelles de temps plus longues, $\Delta t \gg \tau_R$, la diffusion rotationnelle "randomise" la direction de propulsion et la particule suit une marche aléatoire dont la taille du pas est le produit de la vitesse d'auto-propulsion et du coefficient de diffusion rotationnelle, donnant lieu à une augmentation du coefficient de diffusion par rapport à sa valeur à temps court, c'est-à-dire à un coefficient de diffusion effectif $D_{eff} = D_T + v_p^2\tau_R/4$. Les différents régimes sont montrés en Fig. 4.1 dans la version adimensionnée du MSD modélisé par l'équation 4.7 pour une ABP ellipsoïde.

4.1.1.1 Modélisation de la forme de la paramécie

Dans le cas d'une particule sphérique, les équations du mouvement dans les directions x et y sont complètement décorrélées et la particule ne subit pas de couple externe dû à sa forme symétrique. Pour généraliser le modèle à une particule ellipsoïde, plus proche de la forme réelle de la paramécie, il faut prendre en compte l'anisotropie du coefficient de diffusion translationnel : la force de traînée est plus importante dans la direction perpendiculaire au grand axe que dans la direction parallèle au grand axe. L'anisotropie de la force de la particule requiert l'introduction d'un tenseur de diffusion dépendant de la direction : $\mathbf{D}_T(\theta) = D_a(\hat{\mathbf{u}} \otimes \hat{\mathbf{u}}) + D_b(\mathbf{I} - \hat{\mathbf{u}} \otimes \hat{\mathbf{u}})$ où D_a est le coefficient de diffusion dans la direction du grand axe, D_b est le coefficient de diffusion dans la direction du petit axe et $\hat{\mathbf{u}} = [\cos \theta, \sin \theta]$ est le vecteur orientation unité.

Dans ces conditions, les équations de Langevin pour la position du centre de masse et l'orientation d'une ellipse ABP en régime amorti s'écrivent

$$\dot{\mathbf{r}} = \beta \mathbf{D}_T(\theta) \cdot [\mathbf{F}_{ex}(\mathbf{r}, \theta) + F_p(\hat{\mathbf{u}})] + \mathbf{w}_T(t) \quad (4.5)$$

$$\dot{\theta} = \beta D_R T_{ex} + w_R(t) \quad (4.6)$$

où le bruit gaussien $\mathbf{w}_T(t)$ possède une moyenne nulle et une matrice de corrélation $\langle w_T^i(t) w_T^j(t') \rangle = 2D_T^{ij} \delta(t - t')$ avec $i, j \in x, y$ et où le bruit gaussien $w_R(t)$ possède une moyenne nulle et une variance égale à $2D_R$. On remarque que, contrairement au cas d'une

particule sphérique, les bruits translationnels en x et y sont corrélés par l'orientation θ puisque \mathbf{D}_T est une fonction de θ . Le terme \mathbf{F}_{ex} modélise les forces externes appliquées sur la particule. L'équation 4.6 pour θ possède également un terme de couple T_{ex} qui prend en compte tout couple externe qui peut être appliqué à la particule.

4.1.1.2 Adimensionnement des équations

Pour réduire le nombre de paramètres, les équations de Langevin 4.5 et 4.6 précédentes sont adimensionnées. Une échelle de taille σ est choisie proportionnelle au petit axe b de l'ellipse, une échelle de temps est donnée par $\tau = tD_a/\sigma^2$ et une énergie est donnée par $\epsilon = k_B T$. Une vitesse sans dimension est introduite à travers le nombre de Péclet $Pe = v_p \sigma / D_a$ qui fournit une mesure du ratio entre mouvement persistant et mouvement Brownien. Le paramètre sans dimension $\xi = D_R \sigma^2 / D_a$ quant à lui, quantifie le ratio entre diffusion rotationnelle et translationnelle. Enfin, un paramètre d'anisotropie est défini comme le rapport $\zeta = D_a / D_b$.

En unités adimensionnées, le MSD d'une ABP ellipsoïde devient

$$MSD(\Delta\tau) = 2(1 + \zeta)\Delta\tau + 2\left(\frac{Pe}{\xi}\right)^2 [\xi\Delta\tau - 1 + e^{-\xi\Delta\tau}] \quad (4.7)$$

Les différents régimes du MSD sont montrés en Fig. 4.1.

4.1.1.3 Forces externes et couples

Les interactions stériques (ou de volume exclu) entre paramécies et piliers sont modélisées par un potentiel répulsif, développé par Berne et Pechukas [120] :

$$V_{BP}(\hat{\mathbf{r}}, \hat{\mathbf{u}}) = 4\epsilon(\hat{\mathbf{u}}) \left[\left(\frac{\bar{\sigma}(\hat{\mathbf{r}}, \hat{\mathbf{u}})}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\bar{\sigma}(\hat{\mathbf{r}}, \hat{\mathbf{u}})}{r} \right)^6 \right] \quad (4.8)$$

où $\hat{\mathbf{r}}$ est la distance entre les centres de masse des deux objets, $\epsilon(\hat{\mathbf{u}})$ paramétrise la force de l'interaction et $\bar{\sigma}(\hat{\mathbf{r}}, \hat{\mathbf{u}})$ est la distance centre-à-centre à laquelle une ellipse d'orientation $\hat{\mathbf{u}}$ entre en contact avec un disque. La force d'interaction est choisie comme constante et la distance centre-à-centre exacte est définie par Perram et Wertheim comme [121, 122]

$$\bar{\sigma}(\hat{\mathbf{r}}, \hat{\mathbf{u}}) = \min_{\lambda} \frac{\sigma_0(\lambda)}{\sqrt{1 - \chi\beta^{-2}(\lambda)(\hat{\mathbf{r}} \cdot \hat{\mathbf{u}})^2}} \quad (4.9)$$

$$\sigma_0(\lambda) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{D^2}{\lambda} + \frac{b^2}{1-\lambda}} \quad (4.10)$$

$$\chi\beta^{-2}(\lambda) = \frac{a^2 - b^2}{a^2 + \frac{1-\lambda}{\lambda} D^2} \quad (4.11)$$

où le minimum est calculé sur $\lambda \in [0, 1]$ et $D = 2r_p$ le diamètre de l'obstacle.

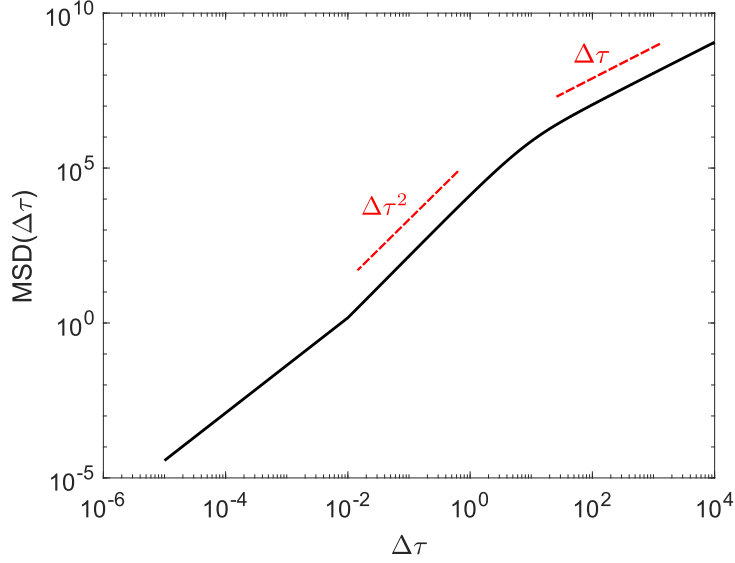


FIG. 4.1 *MSD analytique adimensionné en fonction du pas de temps adimensionné $\Delta\tau$ pour une ABP ellipsoïde en l'absence d'obstacles et d'AR (Eq. 4.7), en échelle log-log. Les paramètres adimensionnés choisis sont $\zeta = 0,75$, $\xi = 0,25$ et $Pe = 120$. Les pentes des régimes ballistiques et diffusifs sont représentées par des lignes rouges pointillées.*

La force appliquée à une ellipse donnée qui résulte de la superposition avec un disque est donnée par $\mathbf{F}(\bar{\sigma}, \hat{r}) = (dV_{BP}/dr)\hat{r}$ et s'applique dans la direction du vecteur entre les centres de masse. L'ellipse est également soumise à un couple $T = [\mathbf{r}^c \times \mathbf{F}] \cdot \hat{z}$ qui est non nul lors d'une collision avec le disque, avec \mathbf{r}^c le vecteur entre le centre de masse de l'ellipse et le point de l'ellipse à la plus petite distance du disque, comme montré en Fig. 4.2. Pour le calcul du couple, la formule de Schreck *et al.* est adaptée pour une ellipse de rapport d'aspect $\alpha = a/b$ [121].

$$T = \frac{bF}{2} \frac{(1 - \alpha^{-2}) \tan \kappa}{\sqrt{(\alpha^{-4} + \tan^2 \kappa)(\alpha^{-2} + \tan^2 \kappa)}} \quad (4.12)$$

$$\tan \kappa = \alpha^{-2} \tan(\psi - \theta) \quad (4.13)$$

Dans la suite, le potentiel adimensionné $\tilde{V} = V_{BP}/\epsilon$ sera considéré, ainsi que les forces et couples adimensionnés,

$$\tilde{\mathbf{F}}_{ex} = \frac{b}{\epsilon} \sum_i F_i \hat{r}_i \quad \text{and} \quad \tilde{T}_{ex} = \frac{1}{\epsilon} \sum_i T_i \quad (4.14)$$

où les forces et couples totaux exercés sur l'ellipse sont composés de la somme des interactions potentielles entre différents piliers i et l'ellipse.

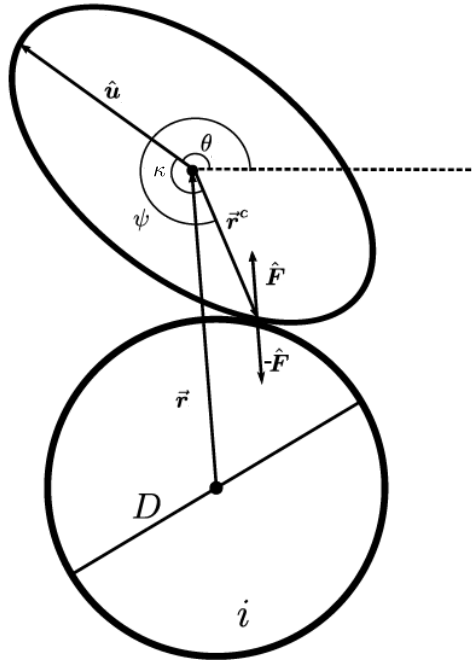


FIG. 4.2 Géométrie d'une ellipse auto-propulsée en contact avec un obstacle i circulaire de diamètre D et immobile. L'angle θ mesure l'orientation de l'ellipse par rapport à l'horizontale (axe x), notée $\hat{\mathbf{u}} = \cos \theta \hat{\mathbf{x}} + \sin \theta \hat{\mathbf{y}}$. ψ mesure l'angle entre le vecteur de séparation centre-à-centre $\vec{\mathbf{r}}$ et l'axe x . Le vecteur unité $\hat{\mathbf{F}}$ montre la direction de la force exercée sur l'ellipse due à la superposition avec l'obstacle et définit le point de contact $\vec{\mathbf{r}}^c$. κ mesure l'angle entre $\hat{\mathbf{u}}$ et $\vec{\mathbf{r}}^c$.

4.1.1.4 Modélisation de la réaction d'évitement et de la mécanosensibilité

Afin de s'approcher le plus possible du comportement de la paramécie, la Réaction d'Évitement a été intégrée empiriquement dans le modèle à partir des analyses des expériences comportementales. L'AR est constituée (*i*) d'une phase de nage arrière pendant laquelle le sens de la nage s'inverse à direction constante, puis (*ii*) d'une phase de réorientation à vitesse de translation nulle. La durée de la nage arrière est tirée aléatoirement selon une loi gaussienne de moyenne 156 ms et d'écart-type 80 ms mesurés expérimentalement (cf. notre papier [56]). La nage arrière se produit à la même vitesse de nage que pendant la nage avant. La nouvelle orientation (à l'issue de l'AR) est tirée depuis une distribution uniforme dans l'intervalle $[-\pi, \pi]$ et la particule se réoriente avec une vitesse angulaire constante Ω d'un angle $\Delta\theta$ égal à la différence entre sa nouvelle orientation et son angle initial. Cette vitesse angulaire est définie comme l'angle de réorientation moyen $\pi/2$ divisé par la durée moyenne de la réorientation, que nous avons mesurée ex-

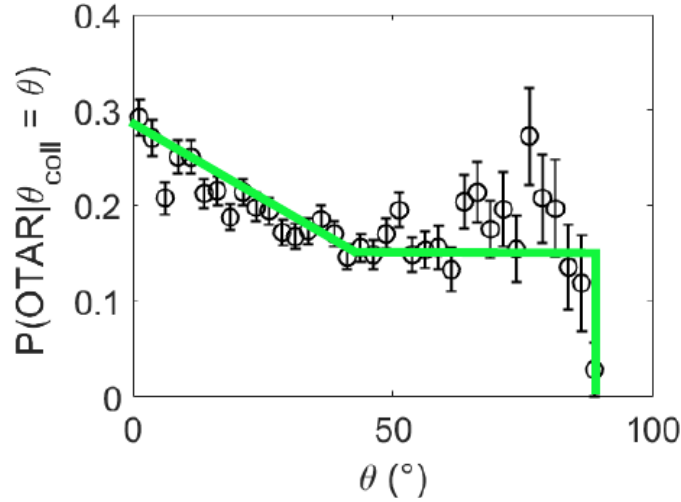


FIG. 4.3 Probabilité d'OTAR conditionnée à l'angle de collision θ_c en fonction de θ_c . La largeur d'un bin est de $2,5^\circ$. La modélisation de cette probabilité, donnée par l'équation 4.15, est symbolisée par une ligne verte.

périmentalement comme égale à 465 ms. La durée de la réorientation est ainsi donnée par $\Delta\theta/\Omega$.

Dans ces simulations les deux types d'AR observées expérimentalement sont prises en compte : l'OTAR, signature de la mécanosensibilité, qui se produit après une collision avec un obstacle et la SAR qui se produit spontanément. Le temps entre deux SAR successives est tiré d'une loi de Poisson (Fig. 2.13) avec un temps d'attente qui dépend de la vitesse de nage des paramécies, et qui a été choisi à 3,75 s à partir des données expérimentales, pour des paramécies nageant à une vitesse v_p comprise entre $500 \mu\text{m/s}$ et $600 \mu\text{m/s}$.

À chaque collision avec un obstacle se produisant avec un angle de contact θ_c , une OTAR a lieu avec une probabilité $P(OTAR|\theta_c)$ (Fig. 4.3) tirée des résultats expérimentaux. Pour les simulations, la courbe est approximée par la fonction suivante, qui résulte d'un ajustement linéaire des données :

$$P(OTAR|\theta_c) = \begin{cases} -0,33\theta_c + 0,3 & \text{pour } \theta_c \in [0; 45]^\circ \\ 0,2 & \text{pour } \theta_c \in [45; 90]^\circ \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (4.15)$$

De plus, les effets d'habitude sont pris en compte (section 3.6) en ajoutant un préfacteur devant la probabilité d'OTAR, donné par $1 - \exp(-\tau_c/\tau_c^*)$, où τ_c est la durée depuis la collision précédente et $\tau_c^* = 0,8$ s est le temps caractéristique associé à l'habitude. Ce préfacteur est obtenu en fittant les données expérimentales montrées en Fig. 3.17A.

Les effets de sensibilisation n'ont pas été inclus.

Les particules peuvent être simulées selon trois configurations :

1. avec des SAR+OTAR, comme une paramécie wild-type,
2. avec uniquement des SAR, comme une paramécie non mécanosensible,
3. sans aucune AR (ni SAR, ni OTAR), comme une paramécie mutante de type Pawn.

4.1.1.5 Effets de piégeage

Dans les simulations, ce qui détermine si une paramécie peut nager entre deux piliers proches est le rapport entre la force d'interaction pilier-paramécie et la force d'auto-propulsion de la paramécie. La force d'interaction pilier-paramécie est choisie de telle sorte à ce que l'espace inter-pilier minimum dans lequel une paramécie peut nager est de $10\ \mu\text{m}$. Cette valeur a été déduite des travaux de Schnitzler *et al.* [103].

Inclure cette modélisation plus réaliste des interactions entre paramécies et piliers a eu pour conséquence de faire émerger du piégeage. La paramécie se retrouvait bloquée dans des impasses créées par certaines configurations d'obstacles en topologie aléatoire. Cela se produisait lorsqu'au contact d'un pilier une OTAR n'était pas déclenchée, mais que la paramécie restait bloquée contre celui-ci à cause des autres obstacles environnants. Dans ce cas, si la paramécie reste au contact d'un même pilier pendant une certaine durée, alors une nouvelle OTAR est déclenchée. Cette durée est choisie comme le temps caractéristique des SAR, soit 3,75 s.

4.1.1.6 Choix des paramètres

Le domaine de simulation est un carré de taille $L \times L$ de même largeur que dans les expériences, *i.e.* $L = 30\ \text{mm}$. Toutefois, des conditions au bord périodiques sont utilisées pour simuler un domaine infini afin d'étudier des dynamiques à plus long temps que celles mesurées lors des expériences. Les dimensions de l'ellipse ABP, de grand axe $2a = 137\ \mu\text{m}$ et petit axe $2b = 58,9\ \mu\text{m}$, et des obstacles circulaires, de rayon $r_p = 142,5\ \mu\text{m}$ sont choisis en accord avec les valeurs mesurées expérimentalement. Pour chaque environnement, le nombre de piliers est donné par $N_p = \Phi L^2 / \pi r_p^2$, arrondi au plus proche carré dans le cas des réseaux carrés. Pour la topologie aléatoire, la position du centre de chaque pilier est choisie aléatoirement selon une distribution uniforme, avec condition de non superposition. De la même manière, la position initiale des paramécies est choisie aléatoirement selon une distribution uniforme en s'assurant que l'ellipse ne se superpose pas avec un obstacle. Son orientation initiale est également choisie aléatoirement selon une distribution uniforme dans l'intervalle $[-\pi, \pi]$.

Pour rappel, dans les équations du mouvement adimensionnées, les seuls paramètres sont $\zeta = D_a/D_b$, $\xi = D_R b^2/D_a$ et $Pe = v_p b/D_a$. Dans ces paramètres apparaissent D_a , D_b et D_R que nous avons essayé de mesurer expérimentalement. Comme nous le verrons en section 4.1.2.1, nous n'avons malheureusement réussi qu'à donner une estimation très préliminaire de D_R , de fait insuffisante pour être utilisée dans les simulations.

A défaut, nous nous sommes donc appuyés sur les résultats de simulations numériques d'écoulements de Stokes rapportés dans la littérature. Pour des ellipsoïdes de rapport d'aspect $\alpha = a/b = 2,326$, nous avons retenu la valeur $\zeta = 0,75$ [123]. Toutefois, cela suppose que la principale source de bruit dans le mouvement de la particule Brownienne est due aux collisions avec les molécules du fluide environnant. Étant donné que la taille de la paramécie est de l'ordre de la centaine de microns, une source plus réaliste de bruit translationnel serait plutôt des fluctuations dans le battement des cils. Ainsi, une mesure de D_a et D_b serait toujours requise pour quantifier précisément les fluctuations dans la nage de la paramécie.

Puisque D_a est inconnu, la relation entre le temps des simulations adimensionné τ et le temps expérimental t est donné par :

$$\tau = \frac{(1/Pe)}{(b/v_p)} t \quad (4.16)$$

de telle sorte que le temps qu'une paramécie prend pour parcourir une distance de l'ordre de son petit axe b , b/v_p , est de l'ordre du temps adimensionné que prend une particule simulée pour parcourir une distance de simulation, $L = l/b$.

Pour choisir une valeur pour ξ , des trajectoires simulées ont été comparées visuellement avec des trajectoires expérimentales. Diminuer ξ permet de rendre les "runs" (portions de trajectoires entre 2 SAR) plus droits. La Fig. 4.4 montre que les trajectoires simulées avec $\xi = 0,25$ reproduisent qualitativement les trajectoires expérimentales, c'est-à-dire des "runs" droits dont les longueurs sont distribuées exponentiellement. Inversement, de grandes valeurs de ξ correspondent à des "runs" courbés, qui diffèrent qualitativement des observations expérimentales, comme montré dans l'annexe D, Fig. D.1. Notons que dans ces simulations, les mouvements hélicoïdaux observés dans les trajectoires réelles de paramécies ne sont pas pris en compte. Nous avons choisi un nombre de Péclet $Pe = 120$.

4.1.1.7 Statistiques et coefficients de diffusion

Pour chaque condition (un ϕ et une topologie donnés), 64 trajectoires sont simulées. Chaque trajectoire dure un temps adimensionné $\tau = 10000$.

Le MSD est calculé sur toutes ces trajectoires et un coefficient de diffusion est extrait en

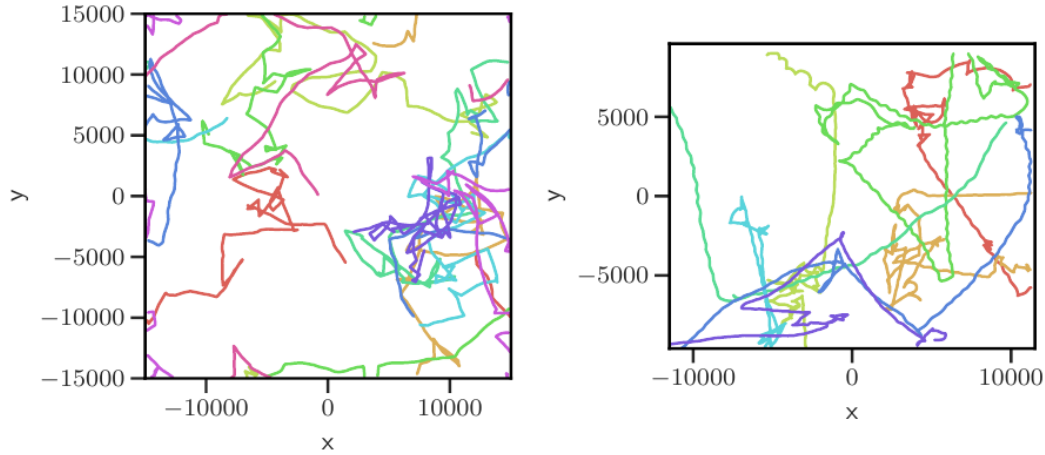


FIG. 4.4 Trajectoires simulées (*gauche*) et expérimentales (*droite*) de paramécies en l'absence d'obstacle ($\Phi = 0$), en microns. Étant donné que les trajectoires expérimentales, issues des films au grandissement "0,58X" (voir section 2.1.3), ont une durée moyenne de 150 s, seules les 150 premières secondes des trajectoires simulées sont montrées, avec $\xi = 0,25$.

ajustant le MSD sur le régime diffusif obtenu à temps long par une fonction $f(\Delta\tau) = 4D_{eff}\Delta\tau$ (Eq. 4.4). Le coefficient ainsi obtenu est normalisé par D_0 , sa valeur dans le cas d'une ABP ellipsoïde en l'absence d'obstacle et d'AR, et dont le MSD est décrit par l'équation 4.7. Pour le choix de paramètres décrit plus haut, $D_0 = 28801$ en unité adimensionnée.

4.1.2 Expériences comportementales

4.1.2.1 Expériences en champ large

Afin d'estimer les coefficients de diffusion rotationnelle D_R et translationnelle D_a et D_b chez la paramécie, nous avons effectué des expériences sur des paramécies mutantes de type Pawn en champ large. Dans le cas de paramécies wild-type, ces coefficients de diffusion sont mesurés en découpant les portions de trajectoires entre les AR (les "runs"), puis en calculant le MSD sur ces données. L'intérêt de choisir ces mutants pour ces mesures est que les trajectoires nous renseignent directement sur la diffusion rotationnelle et translationnelle puisqu'aucune AR ne vient biaiser les trajectoires. Les mesures sont effectuées grâce au même dispositif expérimental en nage libre que décrit en section 2.1.3. La piscine est cette fois-ci de largeur $L = 50$ mm afin d'observer les trajectoires sur de longues distances. La fréquence d'acquisition est de $f_\alpha = 20$ Hz et un pixel a une taille

$l_\alpha = 11,2 \mu\text{m}$, ce qui donne un champ d'acquisition relativement large, de $22,9 \times 27,4$ mm.

Sous ces conditions, $M = 3$ expériences ont été réalisées. Les trajectoires circulaires sont retirées et uniquement les trajectoires longues d'au moins 1000 s sont conservées, donnant un total de $N = 29$ trajectoires.

La Figure 4.5 montre des exemples des trajectoires de paramécies mutantes de type Pawn. Nous avons calculé le MSD sur l'ensemble des trajectoires et ajusté le MSD par l'équation correspondante pour une ABP sphérique (Eq. 4.3). Nous obtenons un bon accord entre les deux courbes ($R^2 = 0,99$), ce qui nous permet de déterminer le coefficient de diffusion rotationnel $D_R = 0,063 \text{ s}^{-1}$ et un temps typique d'environ $\tau_R \simeq 16$ s. En guise de comparaison, on peut exprimer D_R en fonction des paramètres adimensionnés des simulations estimés par comparaison avec les trajectoires réelles, tel que $D_R = v_p \xi / (Pe b)$. On obtient $D_R = 0,016 \text{ s}^{-1}$, proche d'un facteur 4 de la valeur mesurée expérimentalement ce qui confirme le bon choix des paramètres des simulations.

Toutefois, ce résultat reste très préliminaire et des mesures plus précises seront nécessaires par la suite avant de pouvoir intégrer les mesures expérimentales de diffusivité dans les simulations. En effet, le régime diffusif observé n'est pas très important comme le montre le MSD en échelle log-log (encart de la Fig. 4.5B). Cela peut être dû à une longueur de trajectoires encore trop faible, ce qui pourrait être corrigé en suivant les paramécies sur des temps beaucoup plus longs, avec des méthodes de suivi automatisé (voir section 5.5). Cette technique permettrait de déterminer D_a et D_b , ainsi que $D_{eff} = D_T + v_p \tau_R^2 / 4$ que nous ne pouvons pas obtenir actuellement.

Par conséquent, nous avons pour l'instant conservé les paramètres estimés pour les simulations ($Pe = 120$, $\zeta = 0,75$ et $\xi = 0,25$).

4.1.2.2 Calcul des moyennes

Nous avons calculé à l'échelle d'un environnement donné, la fréquence moyenne d'AR, la fréquence moyenne de collision ou la probabilité moyenne d'OTAR. Dans ces cas là, la moyenne est calculée sur les expériences. Par exemple, en notant respectivement N_{AR}^m et T_{obs}^m le nombre total d'AR et le temps d'observation total mesurés pour l'expérience numéro m d'un type d'environnement donné, la fréquence d'AR pour l'expérience m est calculée :

$$f_{AR}^m = \frac{N_{AR}^m}{T_{obs}^m} \quad (4.17)$$

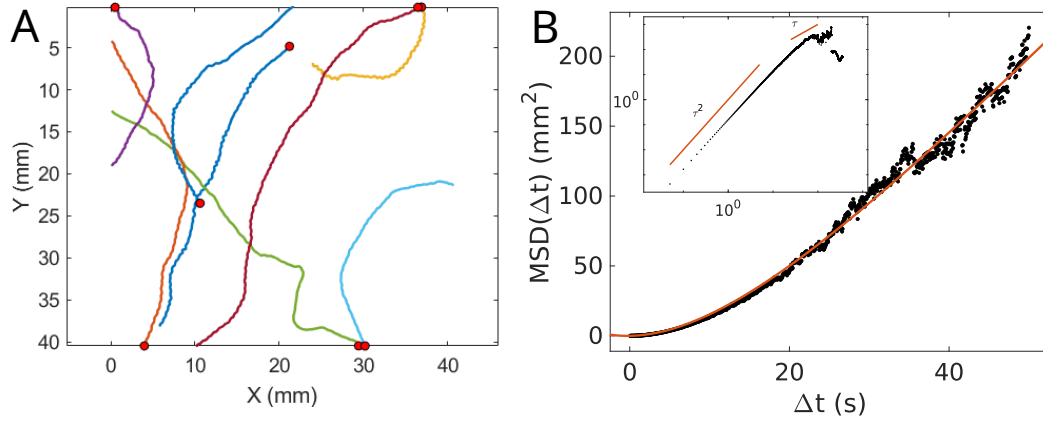


FIG. 4.5 (A) Trajectoires de paramécies mutantes de type Pawn dans une piscine de côté $L = 50$ mm. (B) MSD en fonction du pas de temps pour les $N = 29$ trajectoires de paramécies Pawn (points noirs) et l'ajustement du MSD par l'équation 4.3 (ligne rouge). Le coefficient de détermination est de $R^2 = 0,99$ et les paramètres extraits valent $D_T = 0,027 \text{ s}^{-1}$, $D_R = 0,063 \text{ s}^{-1}$ et $\beta F_p = 15,23$. Encart : MSD en fonction de Δt en échelle log-log, avec les pentes des régimes balistique et diffusif marquées en rouge.

Une fréquence moyenne d'AR pour la condition donnée est obtenue en moyennant sur toutes les autres expériences correspondant à cette condition :

$$\langle f_{AR}(\phi) \rangle = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M f_{AR}^m \quad (4.18)$$

Similairement, pour la fréquence de collision, en notant N_c^m le nombre de collisions mesurées lors de l'expérience m de la condition considérée :

$$f_c^m = \frac{N_c^m}{T_{obs}^m} \quad (4.19)$$

Et pour la probabilité d'OTAR, en notant respectivement N_{OTAR}^m et N_{SE}^m le nombre d'OTAR et de SE mesurées pour l'expérience m :

$$P(OTAR)^m = \frac{N_{OTAR}^m}{N_{OTAR}^m + N_{SE}^m} \quad (4.20)$$

4.1.2.3 Statistiques

Concernant les données et résultats expérimentaux qui composent ce chapitre, d'autres expériences ont été incluses, afin d'augmenter la statistique et d'ajouter un point de donnée, à $\Phi = 0,20$ en topologie aléatoire. Le tableau 4.1 résume les principales statistiques

issues des analyses de données pour les expériences dans des environnements à obstacles, à fraction de surface (de $\Phi = 0$ à $\Phi = 0,28$) et topologie (carré, aléatoire ou sans obstacle) variées.

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0,083	17	882	217	1686	2115
0,14	15	997	254	3311	5017
0,20	9	512	122	1616	3030
0,28	16	578	141	1719	5065

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0,012	13	903	202	2405	278
0,083	10	1036	276	4111	1884
0,14	12	741	191	2521	3546
0,20	6	323	79,2	668	1843
0,28	10	663	135	1423	4987

Φ	M	N_{traj}	T_{obs}	N_{AR}	N_c
0	18	1205	265	2987	0

TABLE 4.1 – Résumé des principales statistiques issues des données d’analyse pour les expériences dans des environnements à fraction de surface et topologie de piliers variés, pour $r_p = 142,5 \mu\text{m}$. Les tableaux du haut, du milieu et du bas correspondent respectivement à une topologie carrée, aléatoire et sans obstacle.

4.2 Résultats

4.2.1 Collisions et AR dans des environnements à obstacles

Comment évolue la fréquence de collision en fonction de la fraction de surface de piliers Φ et de la topologie? Expérimentalement, la Fig. 4.6A montre l’évolution de la fréquence moyenne de collisions en fonction de Φ pour la topologie aléatoire (cercles bleus) et carrée (carrés rouges). Comment modéliser $f_c(\Phi)$ pour une distribution aléatoire d’obstacles? La densité d’obstacles est Φ/s , avec $s = \pi r_p^2$ la surface d’un pilier de rayon r_p . La distance moyenne entre deux obstacles centre à centre est alors $\sqrt{s/\Phi}$ et pour avoir la distance bord à bord, il suffit de retrancher le diamètre d’un obstacle $2r_p$. Finalement, si on suppose que la paramécie nage à vitesse constante v_p , on obtient que la fréquence de collision est

donnée par la formule :

$$f_c^{model} = \frac{v_p}{r_p(\sqrt{\frac{\pi}{\Phi}} - 2)} \quad (4.21)$$

Nous avons ajusté à nos données expérimentales la fréquence de collision expérimentale en topologie aléatoire par cette fonction $f(\Phi) = c_1(\Phi^{-1/2} - c_2)^{-1}$ en fonction de deux paramètres c_1 et c_2 et obtenu un bon accord entre le modèle et la courbe expérimentale dans le cas aléatoire. Le coefficient de détermination est de $R^2 = 0,96$ avec $c_1 = 0,4$ et $c_2 = 1,2$. En connaissant le rayon $r_p = 142,5 \mu\text{m}$, on utilise la vitesse comme paramètre d'ajustement et on obtient $v_p = 106 \mu\text{m/s}$, ce qui est un peu faible (écart d'un facteur 5 par rapport aux vitesses typiques des paramécies) mais reste dans le bon ordre de grandeur, tandis que $2/\sqrt{\pi} \simeq 1,1$ ce qui est proche de la valeur de c_1 . Nous avons également obtenu un bon accord avec les données en topologie carrée.

Les trajectoires simulées montrent une tendance similaire pour la fréquence de collision (Fig. 4.6B). On remarque qu'en l'absence d'AR pour les trajectoires simulées (Fig. 4.6B, symboles vides), la fréquence de collision est différente qu'en présence d'AR (Fig. 4.6B, symboles pleins) en topologie aléatoire. Cela est probablement dû à des effets de piégeage créés par certaines configurations d'obstacles dont la paramécie ne peut s'échapper en l'absence d'AR, selon notre choix de modélisation (voir section 4.1.1.5). Etant donné que cet effet sur la fréquence de collision n'est pas observé expérimentalement (Fig. 4.6A, symboles vides), nous pouvons nous demander si ce choix de modélisation est réaliste. Par la suite, il pourra être intéressant de modifier cette modélisation par exemple en ajoutant un mécanisme d'échappement aux pièges même en l'absence d'AR.

Par ailleurs, nous n'avons observé que de très fines différences au niveau des fréquences de collisions entre des paramécies simulées wild-type et non mécanosensible (données non montrées par souci de lisibilité), principalement à haut Φ . Cela s'explique par le fait que les AR sont dominées par les SAR plutôt que par les OTAR. Ainsi, lorsque les OTAR sont supprimées, la dynamique des réorientations reste globalement inchangée et une mesure macroscopique comme la fréquence de collisions ne capture probablement pas les effets fins de la mécanosensibilité sur l'exploration spatiale.

Le fait que la plupart des AR sont en réalité des SAR est montré en Fig. 4.6C et D où la probabilité de SAR conditionnée aux AR (autrement dit, le ratio entre SAR et SAR+OTAR) est toujours supérieure à 0,6 quelque soit Φ et décroît d'une valeur proche de 1 pour $\Phi = 0,01$ à 0,6 pour $\Phi = 0,28$ pour les trajectoires expérimentales. Une tendance similaire est observée dans le cas des trajectoires simulées, avec plus de similitudes à Φ fixé entre les deux topologies que dans le cas des trajectoires expérimentales.

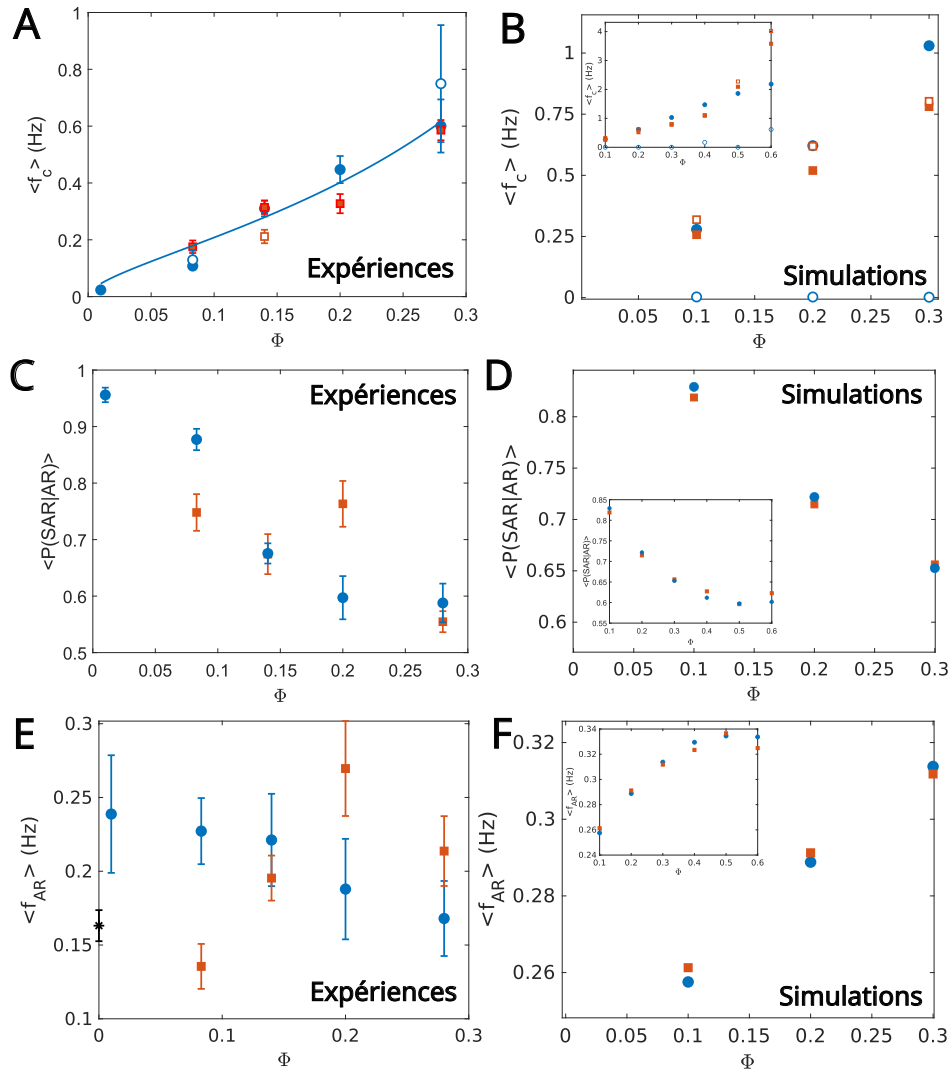


FIG. 4.6 (A-B) Fréquence de collisions, (C-D) probabilité de SAR conditionnée aux AR et (E-F) fréquence d'AR en fonction de la fraction de surface d'obstacle Φ pour la topologie aléatoire (cercles bleus) et carrée (carrés rouges) pour des paramécies WT (symboles pleins) et Pawn (symboles vides), dans le cas de trajectoires expérimentales (gauche) et de trajectoires simulées (droite). Dans le cas des trajectoires expérimentales, chaque point représente la moyenne et l'erreur standard à la moyenne calculée sur M expériences (voir tableau 4.1). La ligne bleue est un ajustement des données expérimentales en topologie aléatoire par l'équation 4.21. Les encarts de la colonne de droite montrent toute la plage en Φ des simulations.

L'évolution de la fréquence d'AR, comprenant à la fois les SAR et les OTAR, en fonction de Φ pour les deux topologies est plus difficile à interpréter (Fig. 4.6C). Nous observons une transition nette entre l'absence d'obstacle (Fig. 4.6C, étoile noire) et la présence de quelques obstacles (limite diluée, $\Phi = 0,01$, cercles bleus) : la fréquence d'AR augmente presque d'un facteur 1,5, probablement dû à l'apparition des OTAR. Nous n'avons pas d'explication à la tendance observée en topologie carrée.

Nous observons dans le cas de la fréquence d'AR pour les trajectoires simulées une augmentation nette de f_{AR} en fonction de Φ , similaire quelque soit la topologie (Fig. 4.6D). Cela est dû au choix de modélisation de la fréquence d'AR $f_{AR} = f_{SAR} + f_{OTAR}$ où $f_{SAR} \simeq 0,2$ Hz est définie grâce aux données expérimentales et est constante pour toutes les fractions de surface, tandis que f_{OTAR} augmente de manière monotone avec Φ , ce qui conduit à une f_{AR} croissante et monotone.

4.2.2 Effets de couloir

Bien qu'à Φ fixé, les paramécies semblent entrer en contact avec les piliers à la même fréquence sans dépendance avec la topologie, nous avons observé un effet de la topologie sur l'orientation. En observant, à Φ fixé, des trajectoires expérimentales de paramécies en topologie carrée (Fig. 4.7A) et aléatoire (Fig. 4.7B), nous nous sommes rendus compte que dans le réseau périodique, les paramécies semblaient contraintes dans des couloirs pendant de longues distances. Elles s'en échappaient à l'issue d'une réorientation, soit lors d'un SE, soit lors d'une AR. Cet effet de couloir crée des orientations privilégiées qui sont celles des axes principaux du réseau carré (axes x et y , c'est à dire $0 \bmod \pi/2$), montrés en Fig. 4.7C comme le maximum de probabilité. Inversement, les orientations les moins observées sont les diagonales, c'est-à-dire $\theta_0 = \pi/4$. Cet effet de couloir est observé en topologie carrée pour tous Φ , comme montré en Fig. 4.7C, mais son intensité augmente quasi-linéairement avec Φ (Fig. 4.7D) : plus le paramètre de maille diminue, plus les couloirs sont étroits, plus l'orientation est verrouillée selon les directions caractéristique du réseau carré. Ces résultats font échos aux travaux de Brun-Cossmme-Bruny sur *Chlamydomonas reinhardtii* dans des réseaux carrés de piliers [117].

Notons, que cet effet de couloir est également conservé dans les simulations (Annexe D, Fig. D.2), ce qui confirme que ces dernières reproduisent les caractéristiques essentielles de la nage des paramécies dans un environnement complexe.

4.2.3 Influence de l'environnement sur la mécanosensibilité

Est-ce que les paramécies "sentent" les propriétés globales d'un environnement ? D'après la section 3.6, des effets de mémoire à longue portée existent. Comment cela se répercute-

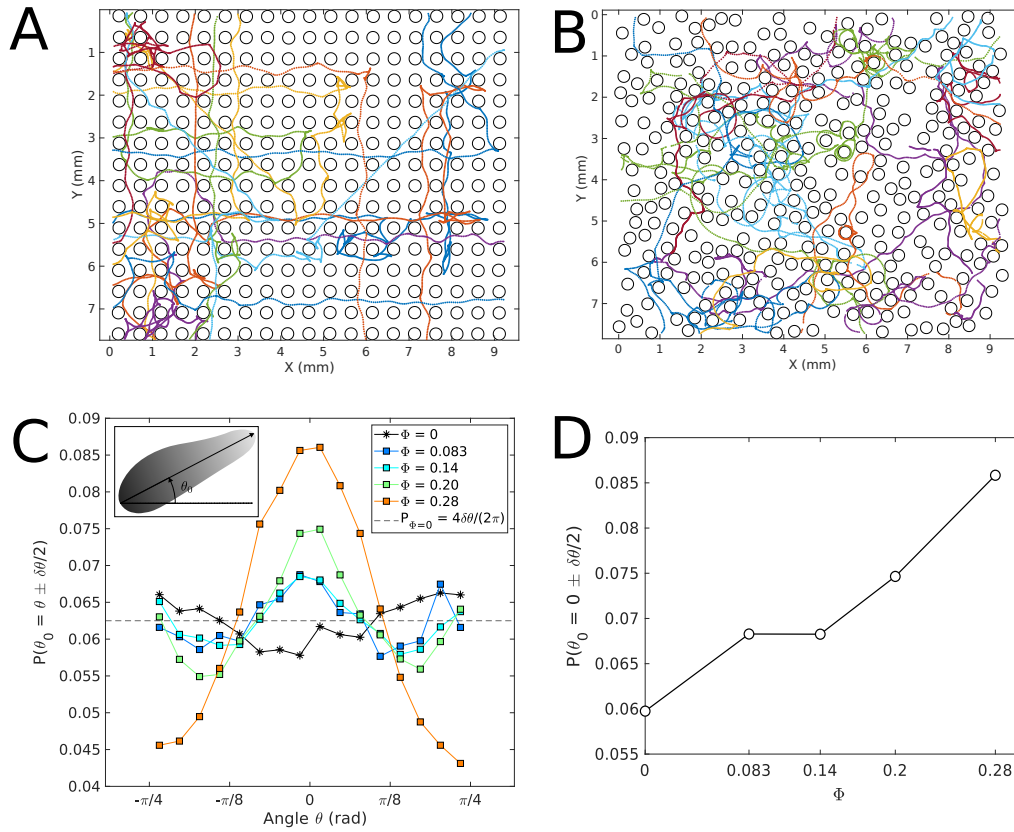


FIG. 4.7 Effets de couloir. Trajectoires expérimentales de paramécies prises au grandissement "1,5X" à $\Phi = 0,28$ dans un environnement carré (A) ou aléatoire (B). (C) Probabilité relative qu'une orientation θ_0 de paramécie ait une valeur angulaire donnée $\theta \pm \delta\theta/2$, avec $\delta\theta = \pi/30$, en l'absence d'obstacle (étoiles noires) et en topologie carrée pour $\Phi = 0,083$ (carrés bleus), $\Phi = 0,14$ (carrés cyans), $\Phi = 0,20$ (carrés verts) et $\Phi = 0,28$ (carrés oranges). La ligne pointillée correspond à la valeur pour une probabilité uniforme. Encart : schéma d'une paramécie orientée d'un angle θ_0 par rapport à l'horizontale. (D) Probabilité relative qu'une paramécie soit orientée dans le sens de l'axe horizontal x en fonction de la fraction de surface d'obstacles Φ dans un réseau carré.

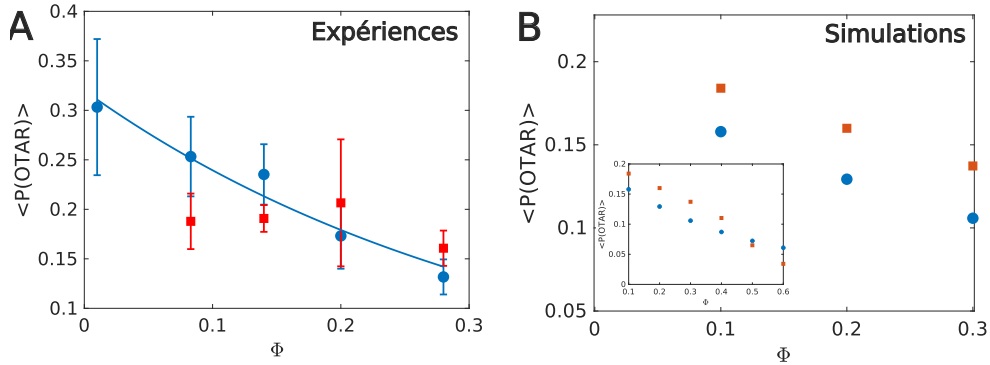


FIG. 4.8 Probabilité d'OTAR en fonction de Φ pour la topologie aléatoire (cercles bleus) et carrée (carrés rouges) dans le cas des trajectoires expérimentales (A) et de trajectoires simulées numériquement (B). L'encart montre la probabilité d'OTAR en fonction de toute la plage de Φ simulée. Pour les données expérimentales, chaque point est la moyenne et le SEM sur toutes les expériences de $P(OTAR)$ calculée sur chaque expérience. La ligne bleue est un ajustement des données expérimentales en topologie aléatoire avec une loi exponentielle $f(\Phi) = c_3 \exp(-c_4\Phi)$ avec $c_3 = 0,32$ et $c_4 = 2,9$ et un coefficient de détermination $R^2 = 0,96$.

t-il sur la mécanosensibilité à l'échelle d'un environnement ? Nous avons mesuré la probabilité d'OTAR moyenne pour chaque environnement et nous observons une diminution monotone dans le cas des données expérimentales en topologie aléatoire (Fig. 4.8 A, cercles bleus). Lorsque Φ augmente, la fréquence de collision augmente également (Fig. 4.6A), et la paramécie est plus affectée par l'habituation, ce qui a pour conséquence de diminuer sa réponse mécanosensible. Pour la topologie carrée (Fig. 4.8 A, carrés rouges), l'effet est moins clair, probablement à cause des effets de couloir qui guident la paramécie et diminuent localement sa fréquence de collision et ainsi l'influence des effets d'habituation.

De manière surprenante, dans le cas des trajectoires simulées, la tendance était presque la même que ce soit en topologie carrée ou aléatoire (Fig. 4.8B). Nous observons également une probabilité d'OTAR globalement plus faible.

4.2.4 Efficacité de l'exploration spatiale

Comment ces effets se répercutent-ils sur l'exploration spatiale de la paramécie ? En utilisant les trajectoires simulées, un coefficient de diffusion a été extrait en ajustant le MSD, pour tous Φ et toutes topologies, en le normalisant par sa valeur D_0 en l'absence d'obstacles.

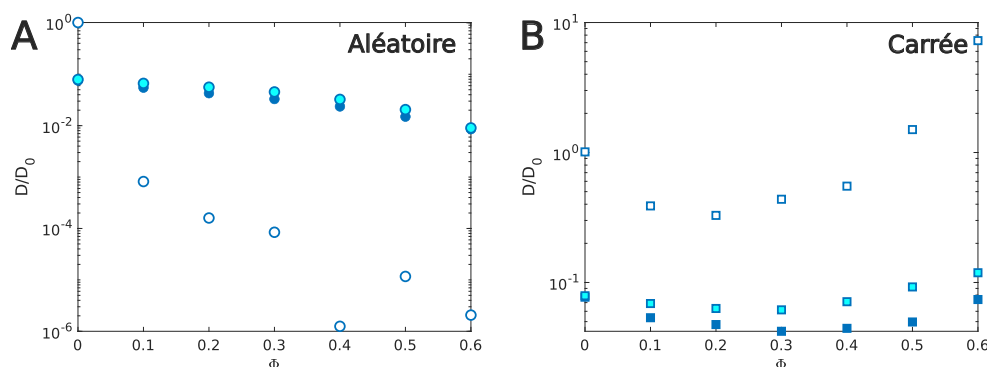


FIG. 4.9 Coefficient de diffusion effectif D_{eff} normalisé par le coefficient de diffusion d'une ABP ellipsoïde en l'absence de piliers et d'AR, D_0 , calculé pour des trajectoires simulées numériquement dans le cas d'une paramécie wild-type (symboles bleus pleins), d'une paramécie Pawn (symboles bleus vides) et d'une paramécie non-mécanosensible, c'est-à-dire qui fait des SAR mais pas d'OTAR, (symboles cyans et bleus), dans le cas d'une topologie aléatoire (A) et carrée (B).

Nous observons dans le cas de la topologie aléatoire que la diffusion décroît de manière monotone avec Φ (Fig. 4.9 A), ce qui est attendu. Nous remarquons également qu'à l'exception de $\Phi = 0$, la paramécie diffuse plus rapidement lorsqu'elle peut déclencher des AR (cercles pleins) qu'en l'absence de celles-ci (cercles vides), ce qui confirme l'intérêt des AR pour l'exploration spatiale d'un environnement complexe. Nous pouvons peut-être expliquer cela par la présence de piégeage à haut Φ pour les paramécies Pawn. Nous n'observons presque pas de différence entre les paramécies mécanosensibles (cercles bleus) et non mécanosensibles (cercles bleus et cyans).

En topologie carrée, les résultats sont plus surprenants (Fig. 4.9 B). D'une part, les Pawn semblent diffuser plus rapidement que les paramécies avec AR, et d'autre part, pour toutes les conditions, nous observons une décroissance de D/D_0 pour $\Phi < 0,2$ et une croissance de D/D_0 pour $\Phi > 0,2$. Il est possible que cet effet soit dû à la présence d'effets de couloirs qui deviennent importants à partir de $\Phi = 0,2$.

Parmi ces deux résultats, l'intérêt de la mécanosensibilité par rapport à des paramécies qui ne font que des SAR n'a pas été très marqué. Dans la section suivante, nous approfondirons ce point.

4.2.5 Variation de la mécanosensibilité

Dans la section précédente, la fréquence des AR augmentait mécaniquement avec Φ . Ici, nous avons voulu comprendre comment, en imposant $f_{AR}(\Phi)$ constant, l'exploration spatiale était affectée lorsque l'amplitude de la réponse mécanosensible était variée. En d'autres termes, quelles sont les conséquences à temps long sur l'exploration spatiale du changement de répartition des AR, entre les OTAR et les SAR.

4.2.5.1 Modélisation de $f_{AR}(\Phi)$

Pour modéliser une fréquence constante d'AR nous l'avons d'abord décomposée selon sa composante spontanée et mécanosensible :

$$f_{AR}(\Phi) = f_{SAR}(\Phi) + f_{OTAR}(\Phi) \quad (4.22)$$

en laissant $f_{OTAR}(\Phi)$ libre et en modélisant la fréquence de SAR comme suit :

$$f_{SAR}(\Phi) = f_{SAR}^{\Phi=0} - f_c(\Phi)P_{OTAR}(\Phi) \quad (4.23)$$

où $f_{SAR}^{\Phi=0} \simeq 0,2$ Hz est la fréquence de SAR en l'absence de piliers, utilisée dans la section précédente, $f_c(\Phi) = 0,4(\Phi^{-1/2} - 1,2)^{-1}$ est issue de la modélisation décrite en Eq. 4.21 ajustée aux données expérimentales (Fig. 4.6A, courbe bleue) et $P_{OTAR}(\Phi) = 0,32 \exp(-2,9\Phi)$ est un ajustement des données expérimentales (Fig. 4.8, courbe bleue).

4.2.5.2 Modélisation de la mécanosensibilité

L'amplitude de la réponse mécanosensible a été modélisée en multipliant par un préfacteur s_{OTAR} à la fois (i) le terme $P_{OTAR}(\Phi)$ de l'Eq. 4.23 qui modélise la fréquence d'AR constante et (ii) l'Eq. 4.15 qui modélise le lien entre mécanosensibilité et angle de collision. En augmentant/diminuant s_{OTAR} par rapport à l'unité, les paramécies sont plus/moins mécanosensibles (plus haute/basse probabilité d'OTAR). Le cas $s_{OTAR} = 1$ correspond à la mécanosensibilité mesurée expérimentalement pour les paraécies wild-type. Nous pouvons également voir s_{OTAR} comme un paramètre qui module la sensibilité de la réponse. Nous avons varié s_{OTAR} dans l'intervalle $[0,2; 2]$ avec un pas de 0,2. Nous n'avons pas pu varier s_{OTAR} au-delà de cet intervalle car le second terme dans l'équation 4.23 devenait supérieur au premier, donnant lieu à des fréquences d'AR négatives. Pour les mêmes raisons, la plage de variation de Φ était limitée.

4.2.5.3 Résultats

Les résultats obtenus pour $\Phi = 0,1$ et $\Phi = 0,3$ sont montrés en Fig. 4.10. Pour la distribution aléatoire de piliers, lorsque la mécanosensibilité augmente, les paramécies

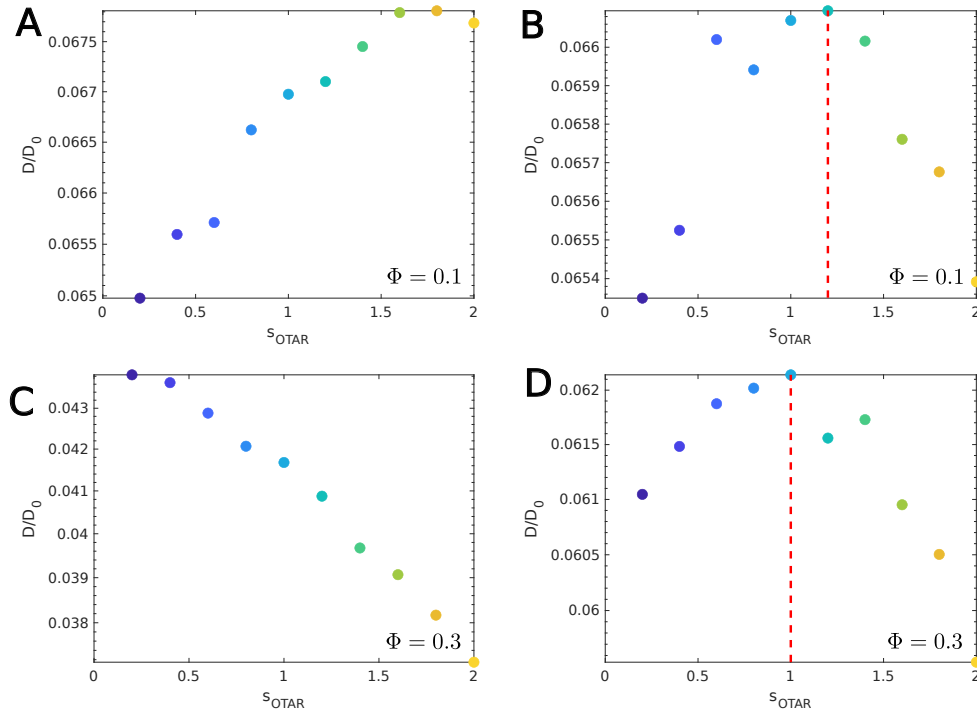


FIG. 4.10 Coefficient de diffusion normalisé en fonction de l'amplitude de la réponse mécanosensible pour $\Phi = 0,1$ (A) et (B) et $\Phi = 0,3$ (C) et (D) pour la topologie aléatoire (A et C) et carrée (B et D).

explorent plus efficacement l'espace à bas Φ qu'à haut Φ . Ce résultat est surprenant. Nous aurions pu nous attendre à ce qu'à faible Φ , dépléter des AR par des OTAR est peu avantageux étant donné qu'il y a peu de collisions, mais la tendance inverse est observée.

Dans le cas des réseaux carrés, la même tendance est observée pour les deux Φ et il semble apparaître un optimum autour de $s_{OTAR} = 1$ dans les deux cas. La paramécie qui explore l'espace le plus efficacement dans un réseau carré est donc la paramécie wild-type que l'on mesure expérimentalement.

Il est toutefois important de noter que les variations de diffusivité observées sont faibles, de l'ordre de quelques pourcents. Au vu de ces résultats préliminaires, l'effet de la mécanosensibilité sur l'exploration spatiale reste un effet très fin. Pour comprendre cela, il sera par la suite nécessaire d'inspecter les trajectoires plus en détail. Par ailleurs, les résultats obtenus semblaient assez dépendants d'à quel point la modélisation de f_{AR} constant était bonne. Ces limites seront à prendre à compte pour les modélisations futures visant à comprendre le rôle de la mécanosensibilité pour la navigation de la paramécie dans des environnements complexes.

Finalement, lorsqu'une paramécie entre en contact avec un pilier, elle finit par s'en

échapper rapidement, que ce soit par une OTAR ou un SE. L'intérêt de la mécano-sensibilité dans ces environnements est atténué par le fait qu'un SE constitue aussi une forme de réaction d'évitement. C'est possiblement pour cela que la variation de la mécano-sensibilité ne joue qu'un rôle fin par rapport à l'exploration spatiale dans les simulations numériques. Une façon de mettre en valeur l'importance de la mécano-sensibilité serait d'ajouter des effets de piégeage dont seules les OTAR peuvent libérer les paramécies, en faisant varier la géométrie des obstacles. Ce serait également une façon de se rapprocher d'environnements plus écologiquement pertinents car il est plus probable qu'un obstacle en environnement naturel comporte un grand nombre d'aspérités auxquelles la paramécie peut s'accrocher plutôt qu'une surface lisse et convexe, comme les piliers cylindriques utilisés dans cette thèse.

Chapitre 5

Conclusion et perspectives

Contents

5.1	Conclusion	125
5.2	Origine moléculaire de la mécanosensibilité	126
5.3	Comportement 3D	134
5.4	Electrophysiologie d'une paramécie stimulée mécaniquement	138
5.5	Suivi automatisé	140

5.1 Conclusion

Nous avons étudié le comportement des paramécies dans des environnements pseudo-2D à piliers, en faisant varier leur fraction de surface et leur topologie. Nous avons montré qu'une AR se caractérise par la succession d'une nage arrière et d'une réorientation, dont la durée et l'amplitude peuvent varier. L'alternance entre ces AR et la nage hélicoïdale dessinent des trajectoires qui ressemblent et ont certaines caractéristiques du "run-and-tumble" des bactéries. Lors d'une collision avec un obstacle, nous avons mis en évidence que deux types d'évènements ont lieu, une AR déclenchée par l'obstacle (l'OTAR), signature de la mécanosensibilité, et une déviation passive de l'obstacle (le SE). Nous avons mesuré que seulement 10% des collisions donnaient lieu à des OTAR ce qui révèle une image différente de celle donnée dans la littérature d'électrophysiologie. Par ailleurs, nous avons montré que l'OTAR se décline en un mode instantané et un mode retardé, de manière analogue aux résultats des mesures de courants de transduction de pores calciques mécanosensibles Piezo sur cellules neuronales. De façon surprenante, modéliser la réponse mécanosensible de manière non-uniforme le long de la membrane de la paramécie ne correspond pas aux mesures expérimentales, ce qui contredit les observations faites dans la littérature d'électrophysiologie des années 1970. Également, la réponse mécanosensible de la paramécie semble d'abord régie par ses dynamiques bioélectriques internes plutôt

que par des déformations auto-induite de la membrane, puisque au vu de nos expériences actuelles, ni la vitesse de nage de la paramécie, ni le rayon de courbure des obstacles ne semblent impacter au premier abord sa réponse. Nous avons également mis en évidence un effet d'habituation qui peut être relativement bien modélisé dans le cadre d'une théorie de la réponse linéaire. Pour étudier le comportement de la paramécie à temps long, nous nous sommes appuyés sur des simulations numériques de particule brownienne active ellipsoïdale. Ces simulations ont été contraintes par nos résultats expérimentaux et nous ont montré qu'en topologie aléatoire, les paramécies wild-type étaient celles qui exploiraient l'espace le plus efficacement comparé à des paramécies non-mécanosensibles ou à des paramécies qui ne font pas d'AR. Dans le cas du réseau carré, c'est l'inverse. Cela est probablement dû à l'existence d'effets de guidage de sa nage le long d'axes préférentiels, ceux imposés par les couloirs du réseau. Enfin, nous avons montré que dans le réseau carré, la probabilité d'OTAR mesurée expérimentalement coïncide avec la valeur qui maximise la diffusion : la paramécie wild-type est optimisée pour naviguer efficacement dans des réseaux carrés.

Dans les parties suivantes, je présenterai quelques perspectives de ce travail, que j'ai commencé à aborder pendant ma thèse et qui méritent d'être poursuivie au-delà de ce travail.

5.2 Origine moléculaire de la mécanosensibilité

Une des premières voies que j'ai commencé à explorer est l'origine moléculaire de la mécanosensibilité. Nous avons déjà évoqué le fait que sous l'action d'un contact mécanique avec la partie antérieure de la paramécie, des canaux mécanosensibles s'ouvrent ce qui dépolarise la membrane via un courant de transduction. Si la dépolarisation est suffisamment importante, un potentiel d'action est déclenché et une AR a lieu. Dans les parties précédentes, nous avons confirmé et approfondi le lien entre collision avec un obstacle et le déclenchement d'une AR, en montrant notamment comment les paramètres géométriques et cinétiques d'une collision impactent la probabilité d'effectuer une AR au contact. Toutefois, d'un point de vue moléculaire, les pores protéiques mécanosensibles impliqués dans cette réponse ne sont toujours pas connus à ce jour.

Nous avons donc commencé à essayer d'identifier la nature des canaux protéiques mécanosensibles dans le cadre d'une collaboration avec Eric Meyer et Célia Fosse (IBENS, ENS Paris). Dans un premier temps, après avoir sélectionné une liste de gènes candidats à la mécanosensibilité, des manipulations génétiques ont été réalisées à l'IBENS par Célia Fosse dans l'équipe de Eric Meyer pour éteindre ensemble ou séparément certains gènes

candidats, comme celui qui contrôle l'expression de la protéine Piezo par exemple. Pour cela, la méthode d'extinction génique par interférence à ARN (ARNi) est utilisée, en nourrissant les paramécies avec des bactéries modifiées génétiquement qui expriment de l'ARN double brin (ARNdb) spécifique. Dans un second temps, l'effet de l'extinction est mesuré à l'échelle comportementale en imageant la nage des paramécies dans des piscines à piliers au LJP et en analysant leurs AR au voisinage des piliers.

5.2.1 Matériels et méthodes

5.2.1.1 Principe de l'ARNi

L'extinction de gène est une méthode d'épigénétique consistant à empêcher la production d'une protéine à partir des gènes codant pour elle. Ce processus peut s'effectuer au niveau du gène et en empêcher la transcription, c'est l'*extinction transcriptionnelle*. Il peut également s'effectuer au niveau de l'ARN messenger (ARNm) et en empêcher la traduction, c'est l'*extinction de gène post-transcriptionnelle* et l'ARNi en est un exemple.

La méthode d'ARNi par nutrition de bactéries produisant de l'ARNdb a été initialement introduite par Fire *et al.* sur le nématode *Caenorhabditis elegans* [124, 125]. Cette méthode a été employée avec succès sur *Paramecium tetraurelia* par Galvani et Sperling [126]. Dans les paragraphes suivants, nous expliquerons simplement le principe général de l'ARNi.

Par quels mécanismes l'ARNdb empêche-t-il la production de la protéine ciblée ? L'ARNdb est clivé toutes les 21 à 25 paires de base par une enzyme appelée Dicer en de petits ARN interférents (pARNi). Dicer les transfère ensuite à un grand complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Les pARNi doubles brins sont séparés en deux brins simples. L'un des deux, dit "passager", est éliminé, tandis que l'autre, dit "guide", est utilisé par les protéines du complexe RISC Piwi ou Argonaute pour trouver l'ARNm possédant une séquence complémentaire. Si la complémentarité entre l'ARNm cible et le "guide" est parfaite, l'ARNm cible est clivé par l'enzyme Slicer et dégradé par le ribosome, tandis que le "guide" est laissé intact. Puisque l'ARNm cible a été détruit, la traduction n'a pas lieu et la protéine correspondante n'est pas exprimée.

Comment sont préparées les bactéries exprimant l'ARNdb correspondant au gène ciblé? Tout d'abord, le gène approprié est conçu avec des outils de génie génétique à partir de la séquence génétique du gène ciblé¹. Ensuite, des plasmides, molécules d'ADN circulaire qui se répliquent indépendamment de l'ADN chromosomique, de type L4440, sont extraits de bactéries *E. Coli* HT115 et des enzymes de restriction découpent par clivage le plasmide au niveau de la séquence de nucléotides caractéristiques, à un endroit spécifique de la séquence appelé *site de restriction* situé entre les deux promoteurs T7. Le gène construit artificiellement est inséré sur ce site de restriction. Une résistance antibiotique à l'ampicilline est également insérée sur le plasmide pour permettre de sélectionner uniquement les bactéries qui expriment ce gène. Les plasmides sont contrôlés et sélectionnés par électrophorèse et ceux qui sont valides sont copiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Enfin, ces derniers sont insérés dans les bactéries par électroporation.

5.2.1.2 Protocole expérimental d'ARNi

Le protocole expérimental détaillé permettant de préparer un milieu dit d'*inactivation* pour la méthode d'ARNi est décrit par Beisson *et al.* [128]. Ce milieu est préparé tous les jours pendant 3 jours d'affilée de telle sorte à ce que les paramécies soient continûment nourries dans le milieu d'inactivation pendant 72h. En principe, ce protocole donne un phénotype visible (dans notre cas, un changement de comportement de nage) en 24-48h, selon le gène ciblé. Notons également que l'inactivation de la protéine ciblée par l'ARNi est transitoire et s'inverse en quelques divisions cellulaires lorsque la paramécie n'est plus dans le milieu d'inactivation mais dans un milieu nutritif classique, comme du WGP bactérié.

Pour chaque expérience, un contrôle sur l'efficacité de l'ARNi est réalisé en inactivant le gène ND7, responsable de l'éjection des trichocystes, soit en même temps que le gène ciblé, soit séparément. Les cellules silencées sont exposées à de l'acide picrique pour évaluer leur capacité d'exocytose. Ce test léthal provoque la sécrétion des organites soumises à l'exocytose, comme les trichocystes, facilement visualisables aux alentours de la paramécie par microscopie à contraste de phase. Lorsque ND7 est silencé, le phénotype observé est la déficience de l'exocytose et la non-éjection des trichocystes. Nous effectuons également un second contrôle sur les paramécies en ne faisant pas subir l'ARNi sur certaines d'entre elles. Lors des expériences comportementales au LJP, nous avons comparé alors ces deux types de cellules contrôles aux autres afin de vérifier que l'ARNi n'induit pas d'autres changements comportementaux que ceux recherchés.

1. Pour rappel, le génome entier de *Paramecium tetraurelia* a été séquencé [127, 24].

5.2.1.3 Expériences comportementales

Les expériences comportementales ont été réalisées dans des piscines à obstacles distribués aléatoirement et en limite diluée ($\Phi = 0.01$), comme dans la partie 3.3.1. Dans cette configuration, la distance moyenne entre obstacles vaut $m = 2400 \mu\text{m}$, soit environ 20 fois la longueur d'une paramécie, ce qui permet de limiter les collisions rapprochées. Pour analyser l'influence sur la mécanosensibilité, la fréquence d'AR, $f_{AR}(r)$, est calculée en fonction de la distance à l'obstacle $r - r^*$ (avec $r^* = r_p + b = 171 \mu\text{m}$ le rayon du volume exclu autour d'un pilier), et est moyennée sur les différentes expériences présentant la même condition.

5.2.2 Inhibition des canaux de type Piezo

Quels peuvent être les candidats à la mécanosensibilité chez la paramécie ? Les protéines trans-membranaires Piezo, présentes chez de nombreux vertébrés, ont montré leur rôle dans la mécanosensibilité [4, 129, 130]. En 2010, Coste *et al.* ont révélé l'existence de familles de canaux ioniques mécanosensibles transmembranaires chez les eukaryotes, composés des canaux Piezo1 et Piezo2 [4]. Les canaux Piezo ont été reliés à une diversité de processus pathologiques et physiologiques, comme la régulation des globules rouges, la division cellulaire ou le système immunitaire inné [130]. Ils sont exprimés dans une grande variété de cellules mécanosensibles et induisent un influx calcique en réponse à différents types de forces extérieures, comme par exemple une force de traction.

Une recherche sur la base de données ParameciumDB [131, 132], qui intègre la séquence du génome de *Paramecium tetraurelia* avec des données génétiques, indique que 6 gènes Piezo ont été identifiés dans le génome de *Paramecium tetraurelia* (https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr/cgi/browse/goterm?term=G0:0008381&organism=ptetraurelia_51_mac). L'outil de recherche BLAST [133], qui permet de comparer plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés, indique que ces gènes sont très proches du gène humain Piezo2, qui code pour l'expression et la production des canaux mécanosensibles à inactivation rapide, de l'ordre de 15 ms [4]. Cette valeur du temps d'inactivation est en accord avec des mesures électrophysiologiques des courants de transduction chez la paramécie, de l'ordre de 25 ms [14].

Lorsque les 6 gènes Piezo ont été silencés individuellement, aucune baisse de mécanosensibilité n'a été observée (Fig. 5.1A pour P1, B pour P2, C pour P3 A et B, C pour P4 A et B). Proche d'un obstacle $r - r^* < 200 \mu\text{m}$, un pic dans la fréquence d'AR est observé, signature de la mécanosensibilité, et se superpose aux contrôles. La fréquence d'AR loin des obstacles $r - r^* > 300 \mu\text{m}$ était la même entre les cellules inactivées et les contrôles, et également égale à celle des cellules en nage libre, ce qui indique un maintien de l'exci-

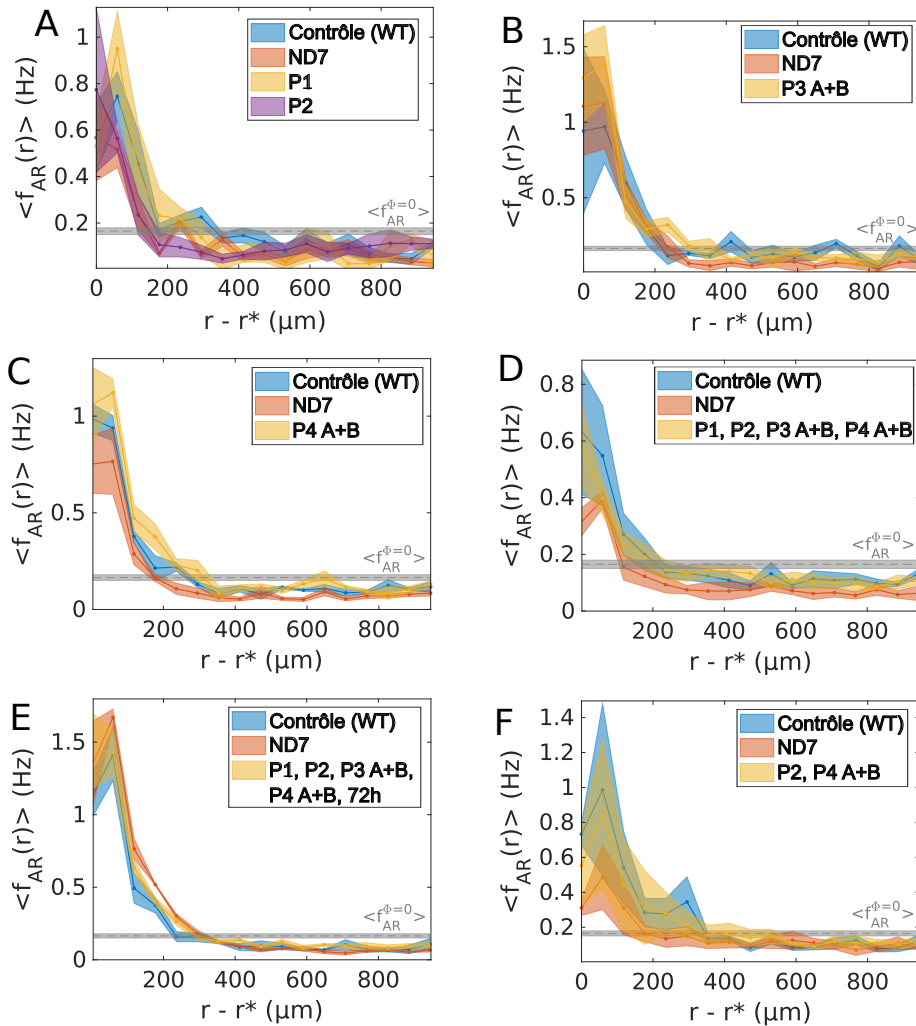


FIG. 5.1 ARNi sur les gènes Piezo. (A) Gène P1 (orange) et P2 (violet) inactivé, 48h de feeding. (B) Gènes P3 A et B inactivés, 48h de feeding (orange). (C) Gènes P4 A et B inactivés, 48h de feeding (orange). (D) Tous les gènes Piezo inactivés en même temps, 48h de feeding (orange). (E) Tous les gènes Piezo inactivés en même temps, ainsi que ND7, 72h de feeding (orange). Un contrôle est effectué sans centrifuger les cellules pendant les manipulations d'ARNi (rouge). (F) Seulement les gènes proches, P2 et P4 A et B sont inactivés en même temps, ainsi que ND7, 72h de feeding (orange). La ligne continue représente la valeur moyenne de $f_{AR}(r)$ et son enveloppe est l'erreur standard à la moyenne. Le contrôle sans ARNi est en bleu, le contrôle sur ND7 est en rouge. Chaque condition est répétée sur $M = 3$ expériences indépendantes. La ligne pointillée grise est la fréquence d'AR en nage libre moyenne, calculée par expérience et moyennée sur $M = 10$ expériences indépendantes, avec l'erreur standard à la moyenne représentée par la région grise autour. Toutes les expériences sont réalisées sur des piscines à obstacles distribués aléatoirement, avec $\Phi = 0,01$.

tabilité des cellules. L'ARNi ne semble pas affecter les autres aspects comportementaux des cellules, comme la vitesse de nage.

Il est toutefois possible que certains gènes soient redondants, et qu'il faille en éteindre plusieurs à la fois pour supprimer véritablement la mécanosensibilité. La Fig. 5.1D et E montre l'effet de l'inactivation des 6 gènes Piezo avec respectivement 48h et 72h de culture des cellules dans le milieu d'inactivation. Augmenter la durée de culture des paramécies dans le milieu d'inactivation permet de s'assurer que les paramécies ont bien ingéré une quantité suffisante de bactéries génétiquement modifiées, ce qui augmente l'efficacité de l'ARNi. Toutefois, aucune des deux expériences ne montre de baisse de mécanosensibilité. Nous avons également ciblé uniquement les couples de gènes les plus proches génétiquement (P2 et P4 A et B, Fig. 5.1F), mais aucune baisse de mécanosensibilité n'a non plus été observée.

Pourtant, des expériences d'ARNi sur les gènes codant pour les canaux calciques voltage-dépendant, (Ca_V1a , Ca_V1b , Ca_V1c) de *Paramecium tetraurelia* [98] ont montré que l'inactivation de 3 gènes en simultané fonctionnait (en l'occurrence par l'extrême réduction de la durée de la nage arrière) et qu'elle était plus efficace que lorsque chacun des gènes était silencé individuellement. Par ailleurs, l'effet de l'ARNi était plus drastique après 72h de culture des paramécies dans le milieu d'inactivation par rapport à 24h ou 48h.

Dans notre cas, il est possible que la présence de 6 gènes Piezo pose un problème technique lié à l'ARNi : d'un côté, la redondance possible entre les gènes rend l'inactivation d'un des gènes Piezo non suffisante pour supprimer la mécanosensibilité ; de l'autre l'efficacité de l'ARNi diminue lorsque le nombre de gènes ciblés augmente. Toutefois, en ciblant les familles de gènes les plus proches (P2 et P4 A et B), une baisse de mécanosensibilité aurait dû être observée, ce qui n'est pas le cas. Une autre possibilité est que les protéines Piezo ne soient pas impliquées dans la mécanotransduction de l'AR, mais ailleurs comme dans l'osmorégulation via les vacuoles contractiles. L'hypothèse qu'il y ait des mécanorécepteurs sur ces vacuoles a déjà été émise [134] et se comprend intuitivement : la vacuole se gonfle d'eau, ce qui augmente la tension de sa membrane jusqu'à un certain seuil, au-delà duquel les mécanorécepteurs s'activent et déclenchent la décharge de la vacuole.

5.2.3 Inhibition de la stomatine

Un autre candidat participant à la mécanosensibilité de la paramécie est la protéine Stomatine [135, 136]. L'une de ses fonctions principales semble être la modulation des fonctions des canaux ioniques [135]. Stomatine a déjà été identifiée dans le génome de la

paramécie et bien qu'il ne s'agisse pas d'un pore, la protéine Stomatine semble avoir un effet sur l'osmorégulation et les AR. En effet, en inactivant un certain type de Stomatine par ARNi, il a été montré que la fréquence d'AR mécanosensibles était diminuée [136]. Cela suggère la formation d'un complexe entre la protéine Stomatine et le mécanorecepteur recherché.

Nous avons donc réalisé des expériences d'ARNi sur les protéines Stomatines de la famille Sto1 A,B,C en suivant la même méthode que sur les protéines Piezo. Pour chaque condition, $M = 4$ expériences comportementales indépendantes sont réalisées. On observe sur la Fig. 5.2A et B que lorsque tous les gènes sont inactivés ou seulement Sto1a, aucune baisse de mécanosensibilité n'est observée.

Nous avons alors essayé lors de l'étape comportementale de supprimer l'étape d'adaptation en milieu inorganique de sorte à imager les cellules directement dans le milieu d'inactivation, c'est-à-dire dans un milieu de WGP avec bactéries modifiées génétiquement. On observe sur la Fig. 5.2C, dans le cas des contrôles, c'est-à-dire avec adaptation de 20 min dans le milieu inorganique (courbe bleue) et sans adaptation, c'est-à-dire directement dans le milieu de culture (courbe rouge), que supprimer l'adaptation n'induit pas de changement comportemental sur la fréquence d'AR ni sur les vitesses (données non montrées). On observe toutefois qu'imager les cellules directement dans le milieu d'inactivation pour Sto1a (courbe violette) montre une baisse de mécanosensibilité, à la fois par rapport aux contrôles et à l'inactivation de Sto1a avec adaptation (courbe orange). Cette observation est confirmée par les courbes individuelles de $f_{AR}(r)$ en Fig. 5.2 qui ne montrent pas la signature de mécanosensibilité dans 3 cas sur 4. On observe également que la fréquence d'AR loin des obstacles est également plus faible que pour le contrôle. Cela suggère que Sto1a est lié à la fois à la mécanosensibilité mais aussi à l'excitabilité, de par son influence sur les AR spontanées. Cela rentre en contradiction avec l'article de Reuter *et al.* [136] qui suggère qu'il y avait autant d'AR spontanées chez les cellules silencées que chez les cellules contrôles.

Ce résultat est surprenant, et nous n'avons pas d'explication claire à ce sujet, d'autant plus que dans le cas chez Reuter *et al.* [136] un effet est quand même observé avec adaptation dans un milieu inorganique (Dryl dans leur cas, voir section 2.1.5 pour la composition chimique des différents milieux). Lorsque l'on supprime la source des siRNA (l'ARN double-brin des bactéries "feeding"), comme lors du transfert dans une solution inorganique, l'expression des gènes peut en effet reprendre rapidement mais à condition qu'une autre source de bactéries (sans ARN double-brin) soit présente. Dans le cas de cellules affamées, les messagers de la croissance végétative ne sont plus produits et le phénotype du silencing devrait persister longtemps. La paramécie a un métabolisme rapide

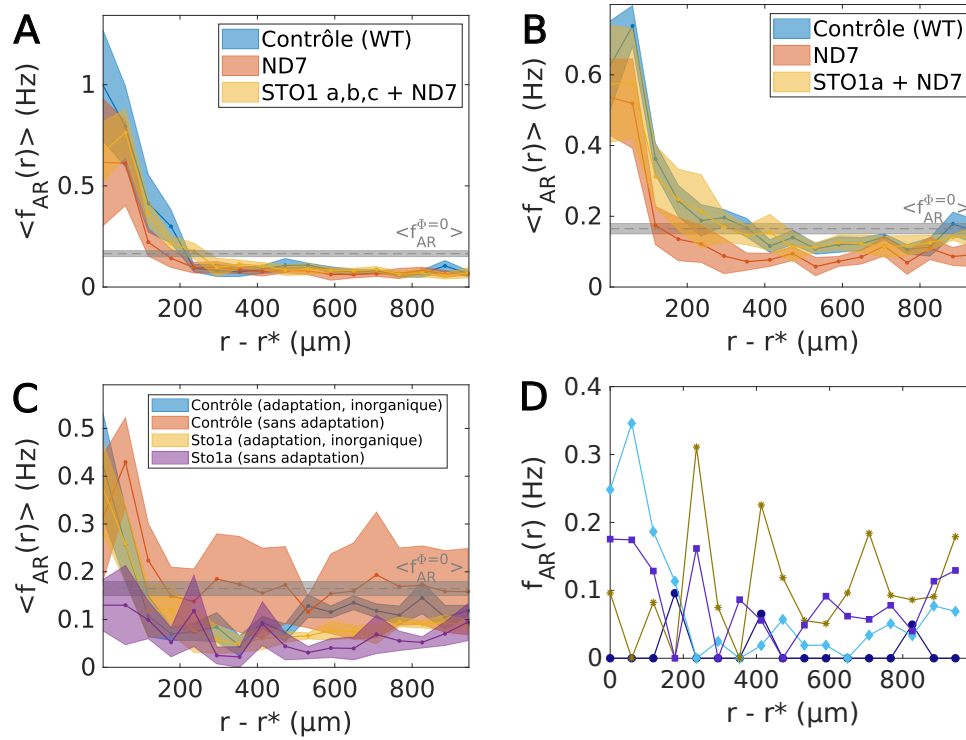


FIG. 5.2 ARNi sur les gènes *Sto*. (A) Gènes *Sto1 a,b,c* et *ND7* inactivés (orange), 72h de feeding. (B) Gènes *Sto1a* inactivés, 72h de feeding (orange). Le contrôle sans ARNi est en bleu, le contrôle sur *ND7* est en rouge. (C) Contrôle, avec adaptation dans le milieu inorganique (bleu) et contrôle, sans adaptation, dans le milieu de culture (rouge). Gène *Sto1a* inactivé, avec adaptation dans le milieu inorganique (orange), 72h de feeding (orange). Gène *Sto1a* inactivé, sans adaptation, dans le milieu d'inactivation, 72h de feeding (violet). La ligne continue représente la valeur moyenne de $f_{AR}(r)$ et la région colorée qui l'entoure l'erreur standard à la moyenne. Chaque condition est répétée sur $M = 4$ expériences indépendantes. La ligne pointillée grise est la fréquence de AR en nage libre moyenne, calculée par expérience et moyennée sur $M = 10$ expériences indépendantes, avec l'erreur standard à la moyenne représentée par la région grise autour. (D) Fréquence de AR $f_{AR}(r)$ pour chacune des 4 expériences dans le cas où *Sto1a* est inactivé, et en absence d'adaptation. Toutes les expériences sont réalisées sur des piscines à obstacles distribués aléatoirement, avec $\Phi = 0.01$.

et se reproduit toutes les 6h sous conditions nutritives optimales. Bien que ce ne soit pas le cas dans une solution inorganique, qui comporte très peu de bactéries, il ne faut toutefois pas exclure qu'en 20 min la cellule puisse produire toutes les protéines et les

transporter jusqu'à la membrane. Avec les incompréhensions sur la baisse de fréquence de AR spontanées et l'absence d'une baisse de mécanosensibilité dans un milieu inorganique, ces résultats sur le lien entre les protéines Sto1 et la mécanosensibilité restent donc à approfondir.

Enfin, il faudra par la suite effectuer à nouveau des expériences sur Piezo en supprimant l'étape d'adaptation dans le milieu inorganique, comme nous l'avons fait pour la protéine Stomatine.

5.3 Comportement 3D

Lors d'une AR, comment la nouvelle direction, à l'issue de la phase de réorientation, est-elle déterminée ? Selon Jennings, la paramécie se réoriente toujours dans la même direction, du côté de la face dorsale (en opposition avec le sillon oral) [45]. Puisque la paramécie tourne également autour de son grand axe, du point de vue d'un observateur extérieur, le changement de direction lors d'une AR est alterné, et peut être considéré comme pseudo-aléatoire. Toutefois, aucune mesure quantitative n'est venue confirmer cette observation. Pour mieux comprendre la dynamique réelle de l'AR, il est alors nécessaire de l'observer en 3D.

Dans la perspective de relier comportement et processus électrophysiologiques (comme l'excitabilité), il est également nécessaire de mesurer précisément les AR en absence de stimulation externe. En effet, il n'est pas clair dans quelle mesure toutes les SAR mesurées dans nos expériences sans obstacle sont réellement spontanées et ne sont pas induites mécaniquement par des collisions avec les faces supérieures et inférieures de la piscine ou par des interactions hydrodynamiques avec les bords. Pour cela, il est alors nécessaire d'observer les AR dans un large volume, loin de parois.

Pour ces raisons, nous avons développé un dispositif expérimental d'observation 3D des paramécies au LJP, basé sur la méthode de stéréoscopie. Le développement du dispositif, les méthodes d'analyse et l'obtention des premières trajectoires 3D ont été réalisés avec l'aide d'Héloïse Uhl, stagiaire de M2 au LJP pendant 6 mois, et dont certains des résultats sont présentés ici.

5.3.1 Matériels et méthodes

5.3.1.1 Montage expérimental et acquisition des images

Le dispositif expérimental est décrit sur la Fig. 5.3A et reprend le principe décrit dans les expériences de Drescher *et al.* [137]. La chambre expérimentale est une cuve de spectroscopie de dimension $1 \times 1 \times 2,5 \text{ cm}^3$, fixée à un support en Plexiglas. Les

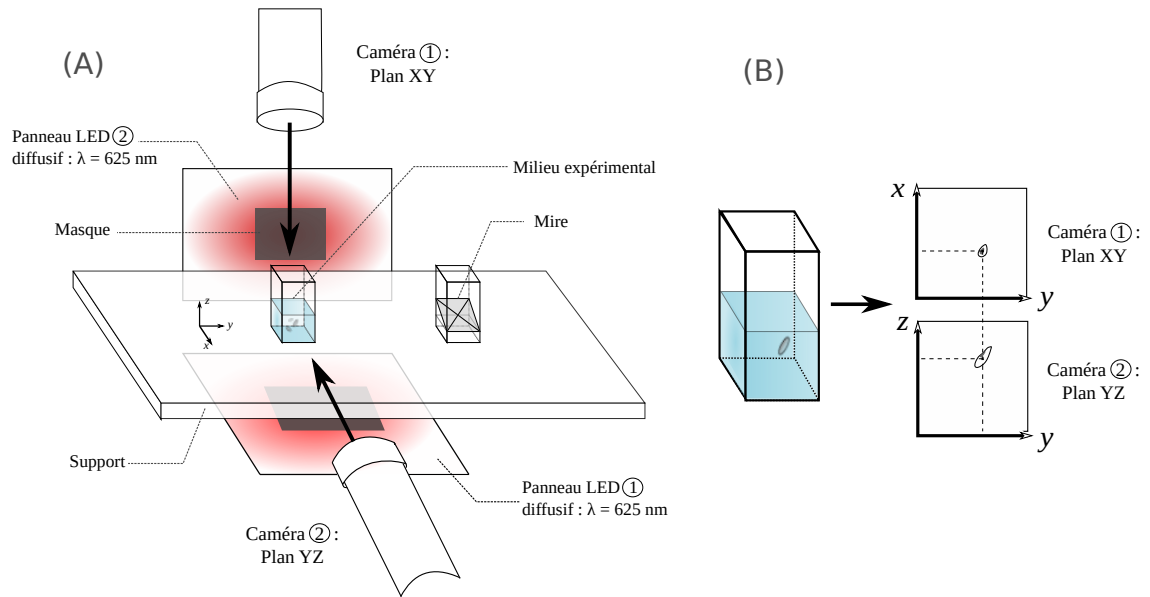


FIG. 5.3 (A) Dispositif expérimental pour l'étude des paramécies en 3D. (B) Schéma d'une paramécie dans la chambre expérimentale, et sa représentation en coupe dans chacun des deux plans.

paramécies sont imagées en 3D à partir de deux caméras identiques à celles décrites en section 2.1.3 et dont les axes optiques sont perpendiculaires : l'une placée horizontalement (Fig. 5.3A, Caméra 1), l'autre placée verticalement (Fig. 5.3A, Caméra 2). La calibration des caméras est réalisée à la main grâce à une mire inclinée à 45° et gravée d'une croix, disposée dans une cuve spectroscopique identique de celle de la chambre d'observation de sorte à obtenir la même projection de la croix dans le plan horizontal et vertical. La mire est mise au point et centrée dans chaque champ d'observation en translatant précisément les caméras. L'éclairage entre les deux panneaux LED est égalisé en réglant la tension imposée à leur bornes selon le profil d'intensité des caméras, donné par le logiciel d'acquisition. L'acquisition des images est synchronisée en déclenchant simultanément les caméras grâce à l'envoi d'un signal TTL externe généré par une carte analogique (National Instruments SCB-68A) qui est interfacée sous MATLAB. En général, deux films de 750 images à $f_\alpha = 25$ images/s sont acquis. Le grandissement choisi donne une taille de pixel de $2,5 \mu\text{m}$ ou $3,2 \mu\text{m}$, selon les expériences.

5.3.1.2 Reconstruction des trajectoires 3D

À l'issue de l'acquisition des images et de leur analyse sous FastTrack sont obtenus deux jeux de données : un jeu de données correspondant aux trajectoires détectées dans le plan XY et un autre pour les trajectoires détectées dans le plan YZ. La méthode

décrite ci-dessous permet de corrélérer les trajectoires dans chaque plan afin d'obtenir leurs coordonnées (x, y, z) . Elle est basée sur le principe qu'une paramécie détectée au même instant sur les deux plans aura une position y identique dans les deux jeux de données (Fig. 5.3B). Chaque paramécie détectée dans le plan XY est comparée avec toutes celles présentes dans le plan YZ et un tableau est créé avec pour chaque paire de paramécies détectées :

- le pourcentage d'images dans lesquelles chaque paire apparaît, noté $p_{com} = \frac{\text{Nombre d'images communes}}{t_f - t_i}$ où t_i (*resp.* t_f) sont respectivement l'indice de la première (*resp.* dernière) image où l'une des paramécie de la paire apparaît (*resp.* est encore présente).
- la moyenne m_{com} de la différence entre les coordonnées communes y du centroïde dans les plans XY et YZ, $y_1 - y_2$ ².

Les trajectoires retenues correspondent aux paires de trajectoires où $p_{com} > 29\%$ et où $m_{com} < 80$ pixels. Ces seuils ont été établis empiriquement après essais et inspections visuelles. Ils permettent d'éliminer les associations de trajectoires aberrantes tout en tolérant les imperfections d'alignement des caméras ou la sortie d'une paramécie du champ d'une caméra.

À l'issue de cette analyse, les coordonnées (x, y, z) du centre de masse, de la partie postérieure et de la partie antérieure de la paramécie sont obtenues. Afin de corriger l'erreur $y_1 - y_2$, si l'on prend comme références les coordonnées (x_1, y_1) du plan XY, la coordonnée z vaut alors $z_2 \times \frac{y_1}{y_2}$.

5.3.2 Résultats préliminaires

Un exemple typique de trajectoire 3D est montré en Fig. 5.4 où l'on peut distinguer le mouvement hélicoïdal et les AR spontanées. La Fig. 5.4B montre l'évolution temporelle de la position y commune aux deux plans et met en évidence le léger décalage positionnel, dû aux erreurs d'alignement des caméras. Cette erreur étant systématique, cela justifie bien la normalisation des coordonnées expliquée en fin de section précédente. Enfin, la Fig. 5.3C montre une AR détectée en 3D, avec les positions des parties antérieures et postérieures identifiées en bleu et rouge qui permettent de renseigner sur l'orientation 3D de la paramécie au cours d'une AR.

Sur les 14 AR analysées, la durée et la longueur moyenne de la nage arrière valent respectivement $95,0 \pm 53,3$ ms et $22,2 \pm 14,6$ μm , ce qui est cohérent avec les mesures effectuées en 2D dans des piscines sans obstacle (voir section 2.2.4 ou notre article [56]). De plus, l'angle de réorientation (angle entre le début et la fin de l'AR) a pu être déterminé

2. On notera 1 (*resp.* 2) l'indice correspondant aux trajectoires issues du plan XY (*resp.* YZ).

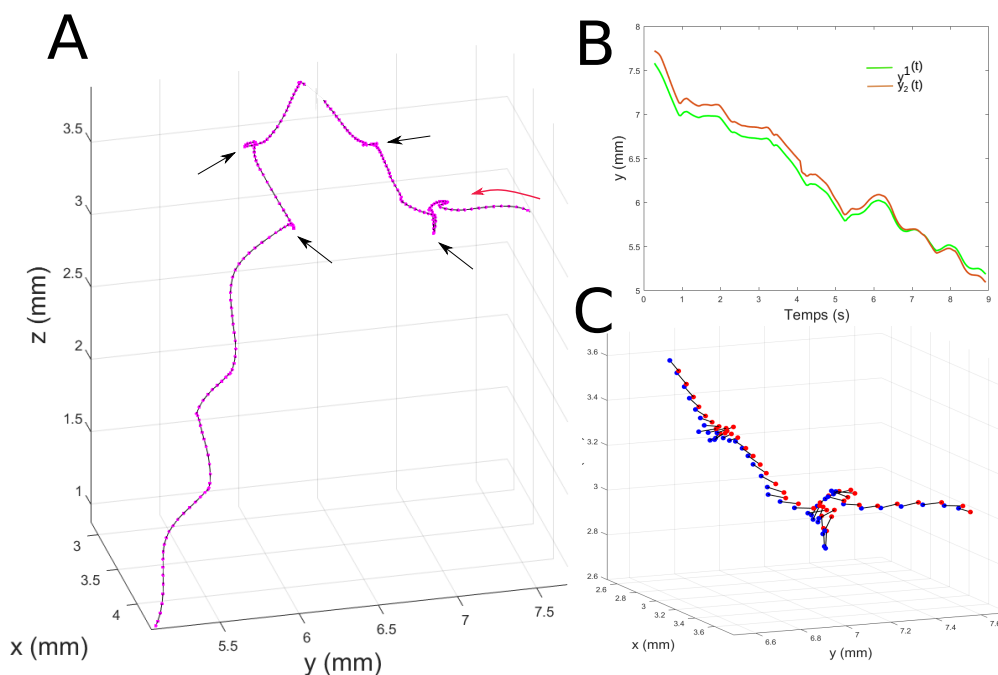


FIG. 5.4 Trajectoires 3D d'une paramécie. (A) Positions du centroïde (x, y, z) (points roses) d'une paramécie au cours du temps, avec le sens de déplacement indiqué par une flèche rouge et les AR par des flèches noires. (B) Positions y_1 et y_2 au cours du temps. (C) Agrandissement d'une trajectoire 3D avec une AR. La partie antérieure est représentée en bleu, la partie postérieure est représentée en rouge et l'axe antéro-postérieur est tracé en noir. Par clarté, seulement une position sur deux est représentée.

et vaut en moyenne $81 \pm 34^\circ$, ce qui est proche de $114 \pm 66^\circ$, la valeur obtenue en 2D [56].

En conclusion, les méthodes utilisées permettent effectivement de reconstruire des trajectoires 3D et les statistiques des AR permettent de confirmer les résultats obtenus en 2D, ce qui est plutôt encourageant. Cela ouvre la perspective d'une observation de la paramécie en l'absence de contraintes géométriques et offre la possibilité d'obtenir de nouvelles caractérisations de sa nage, inaccessibles ou incomplètes lors d'une analyse en 2D. Toutefois, il a été difficile d'obtenir un grand nombre d'AR facilement exploitables. Cela est dû en partie à l'inhérente faible profondeur de champ des 2 objectifs utilisés, ce qui diminue la durée pendant laquelle une trajectoire est nette dans les deux plans. Cela peut être résolu en utilisant des objectifs télécentriques, qui permettent de s'affranchir des effets de perspective et d'augmenter sensiblement la profondeur de champ. Une alternative serait de développer un suivi automatisé en 3D pour garder la paramécie nette sur des temps longs et avec un plus fort grandissement [138]. Cela permettrait d'améliorer

également la résolution spatiale, insuffisante dans nos expériences pour distinguer de manière systématique la position du sillon oral. De manière complémentaire, la détection du sillon oral pourrait se faire par des méthodes de machine learning. Nous avons également été confrontés à des effets de convection, qui biaisaient les trajectoires des paramécies. Un premier dispositif de régulation thermique de la chambre d'observation a été conçu et permet de réduire de moitié la vitesse moyenne du flux convectif. Toutefois, il n'a pas été utilisé dans les résultats préliminaires montrés ci-dessus. À l'avenir, les mêmes expériences pourront être réalisées avec ce dispositif. Une autre possibilité serait de plonger la chambre d'observation dans un bain régulé en température comme cela a été fait par Drecher *et al.* [137].

5.4 Electrophysiologie d'une paramécie stimulée mécaniquement

En guise de comparaison avec nos expériences comportementales en nage non contrainte, des premières expériences d'électrophysiologie en *voltage-clamp* sur des paramécies immobilisées avec stimulation mécanique contrôlée ont également été réalisées à l'Institut de la Vision avec Irene Elices, post-doctorante dans l'équipe de Romain Brette. L'outil de stimulation est un capillaire de 3-4 μm de diamètre qui est d'abord étiré puis dont le bout est arrondi avec une micro-forge. Le zéro du contact est d'abord défini de la manière suivante. On approche l'outil de stimulation à l'aide d'un micromanipulateur motorisé jusqu'à ce qu'un contact entre le bout de l'outil et la paramécie soit visuellement détectable. A chaque stimulation, l'outil est indenté de quelques microns depuis l'origine. Les stimulations mécaniques sont séparées dans le temps d'environ 1,5 s, pour réinitialiser les effets d'habituation (voir section 3.6).

Les méthodes d'électrophysiologie utilisées sont les mêmes que celles présentées dans notre article [56]. Les cellules *Paramecium tetraurelia* sont déciliées selon le protocole décrit par Ogura en ajoutant de l'éthanol à 96 % pour une concentration finale de 5 % d'éthanol dans un tube contenant des paramécies précédemment lavées et adaptées 20 min dans une solution inorganique [139]. Le tube est mis sous agitation pendant 2 min puis laissé à reposer pendant 1 min. Les cellules déciliées sont prélevées au fond du tube, où elles sédimentent en l'absence de cils. Les cils repoussent à nouveau en environ 30 min. Dans certaines expériences, la pousse des cils est bloquée en ajoutant 10 mM de colchicine à la solution extracellulaire. Une goutte de suspension cellulaire est ajoutée sur un lame de microscopie montée sur une plateforme motorisée. Lorsqu'une paramécie est localisée dans le champ de la caméra, les électrodes sont approchées manuellement à l'aide d'un micromanipulateur motorisé et sont implantées dans le cytoplasme de la cellule, comme montré en Fig. 5.5A.

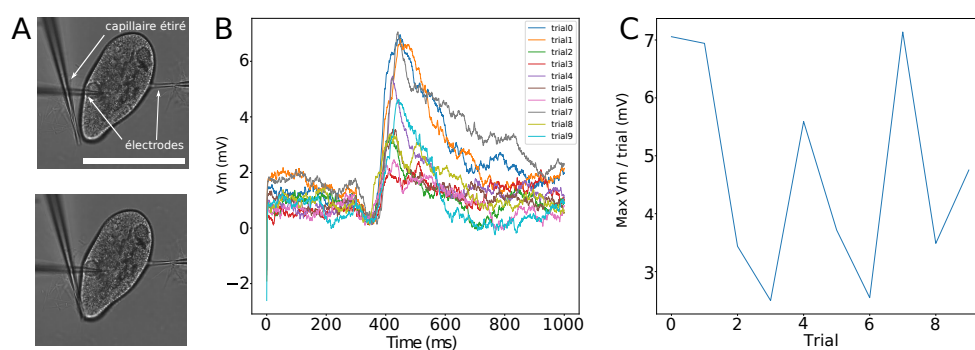


FIG. 5.5 Réponse à une stimulation mécanique contrôlée. (A) Image de microscopie en lumière blanche de *Paramecium tetraurelia* déciliée, implantée avec deux électrodes et soumise à une stimulation mécanique à l'aide d'un capillaire étiré, de 3-4 μm de diamètre, monté sur un micromanipulateur motorisé. Les deux images sont prises à 33 ms d'intervalle, juste avant contact et au moment du contact. La barre d'échelle est longue de 100 μm . (B) Réponses en potentiel à une stimulation mécanique, en fonction du temps, pour différentes stimulations successives séparées de 1,5 s chacune. (C) Amplitude maximale de dépolarisation pour chaque stimulation, en fonction de l'indice de la stimulation.

La Fig. 5.5B montre que sous stimulation mécanique de la partie antérieure de la paramécie, une dépolarisation de la membrane est observée, comme attendu. Par ailleurs, nous avons mesuré l'amplitude maximale de la dépolarisation pour plusieurs stimulations successives (Fig. 5.5C). Pour une raison encore inconnue à ce stade, très peu de cellules montraient une réponse à une stimulation mécanique sur la partie antérieure comme montré sur la Fig. 5.5 : le potentiel fluctuait autour de sa valeur au repos, sans montrer de dépolarisation de la membrane. Pourtant, la paramécie est bien sensible aux stimulations mécaniques induites par l'outil puisque la quasi-totalité des cellules stimulées sur la partie postérieure présentaient une réponse hyperpolarisante. Ce problème nous a empêché d'approfondir la comparaison avec nos expériences, en variant par exemple l'intensité ou la vitesse de stimulation. Cette observation d'un faible taux de réponse fait cependant écho à nos résultats précédents qui montraient que dans nos piscines à obstacles, les OTAR ne représentaient que 10% des collisions (voir section 3.3.2), et va à l'encontre de l'idée véhiculée par la littérature en électrophysiologie qu'une OTAR est systématiquement déclenchée à chaque stimulation mécanique.

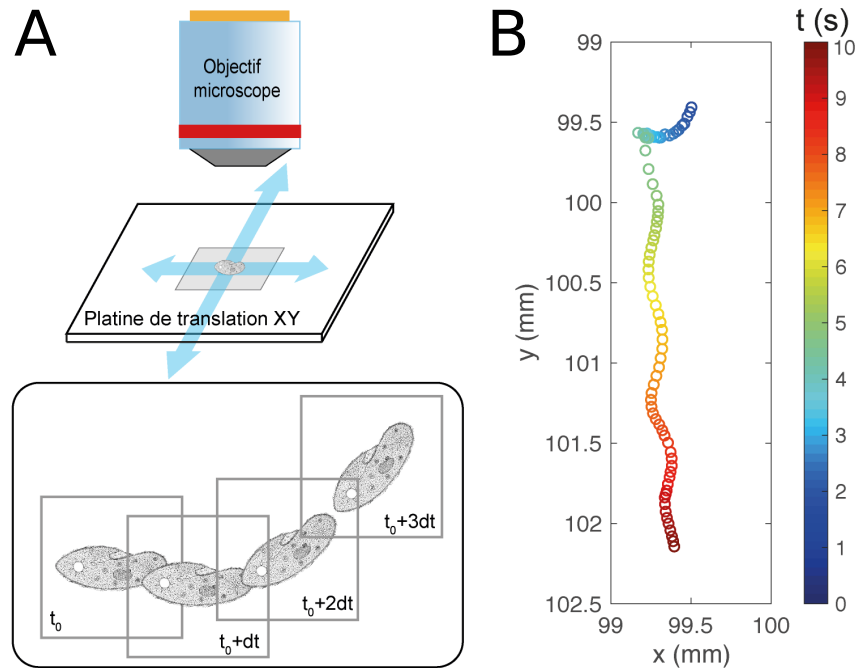


FIG. 5.6 (A) Schéma du principe du suivi automatisé. (B) Trajectoire typique obtenue avec un premier dispositif de suivi automatisé.

5.5 Suivi automatisé

Au cours de nos expériences, nous avons souvent été limités par la longueur des trajectoires et la taille du champ de la caméra. Suivre une paramécie sur des temps longs et de longues distances, tout en ayant une bonne résolution spatiale et temporelle permettrait de poursuivre les travaux sur la diffusion de la paramécie ou bien de corrélérer un grand nombre d'évènements d'AR et de collisions pour étudier les effets de mémoire. Pour cela, nous avons pour projet de poursuivre et terminer le développement d'un dispositif expérimental de suivi automatisé d'une paramécie individuelle entamé au cours de cette thèse.

Des paramécies dans un environnement pseudo-2D en régime dilué sont placées sur une platine de translation motorisée XY (Scan IM 120x100 mm, Märzhäuser) montée sur un microscope droit (BX51WI, Olympus) et imagée par une caméra à haute vitesse et haute résolution (Hamamatsu Orca Flash, 4.0), comme schématisé en Fig. 5.6A. À chaque pas de temps, une caméra prend d'abord une image de la paramécie dont la position moyenne (x, y) dans l'image est détectée par simple seuillage et analyse morphologique. La platine de translation se déplace ensuite de sorte à ramener la paramécie au centre de l'image. Chaque déplacement correspondant $(\Delta x, \Delta y)$ est enregistré et permet de reconstruire a

posteriori la trajectoire complète de la paramécie suivie (Fig. 5.6A).

Pour l'instant, nous avons réussi à suivre une paramécie sur typiquement 300 s, avec une fréquence d'acquisition de 10 à 20 fps. La Fig. 5.6B montre un exemple typique de trajectoire obtenue sur 10 s et met en évidence le mouvement hélicoïdal caractéristique de sa nage. Le dispositif nécessite encore quelques ajustements, notamment pour la résolution des croisements entre paramécies (éventuellement ce problème peut être contourné en se plaçant en limite diluée) ou lorsqu'une paramécie nage trop vite et que la platine ne parvient pas à suivre. Il serait également intéressant d'implémenter le suivi en présence de piliers ainsi que de suivre la paramécie en 3D.

Postface

J'aurais pu achever ce manuscrit ici, mais je réalise qu'il est impossible de se rendre compte de ce qui se cache derrière, tant la langue des sciences est froide et dépourvue d'affects. Par ailleurs, je trouve qu'un récit, même scientifique, est plus agréable à lire lorsqu'il laisse transparaître la subjectivité de celui qui l'écrit, comme c'est le cas dans les articles du début du XXe siècle, plutôt que l'illusion d'objectivité qui est créée par le style impersonnel des articles plus récents.

Par ailleurs, je trouve qu'il est difficile de sortir des rôles qu'on nous assigne, en particulier au sein des institutions, et bien qu'il est confortable (dans une certaine mesure) de rester dans celui du "bon élève", nous éprouvons l'envie de nous défaire du goût amer que ce jeu d'acteur nous laisse. En guise de bain de bouche, je vais donc tenter d'être honnête et d'exprimer en quelques lignes ma trajectoire de pensée sur une existence dans un laboratoire.

Tout d'abord, en tant que doctorants, nous faisons face à une double impasse : tenter sa chance pour un hypothétique poste dans le public et vivre dans la précarité pendant de longues années ou bien travailler dans le privé à des fins qui nous déplaisent. Mais en réalité, le problème n'est pas là. Au fil de ma prise de conscience de l'état du monde, ma passion pour les sciences s'est affaiblie. J'avais de plus en plus de mal à y trouver du sens et je sentais une dissonance entre mon travail de tous les jours au labo et ce que je veux faire exister dans ma vie. Je trouvais que les critiques de la science portées dans les années 70 par quelques scientifiques³ sont plus que jamais d'actualité et que la science telle qu'elle est pratiquée dans les laboratoires ne répond pas aux exigences promises d'une existence désirable pour tous. Lorsque nous avons tenté de faire bouger les lignes au sein de notre propre laboratoire, nous nous sommes heurtés aux excuses de l'inaction⁴ et à un techno-optimisme féroce. Pourtant, la science ne nous a pas sauvé et ne nous sauvera pas. Continuer la recherche scientifique ? Pourquoi pas, mais diminuons-en l'importance. De

3. Grothendieck, A. Allons-nous continuer la recherche scientifique ?. *Écologie & politique*, 52, 159-169. <https://doi.org/10.3917/ecopo1.052.0159>.

4. <https://bonpote.com/climat-les-12-excuses-de-linaction-et-comment-y-repondre/>

mon côté, je me vois possiblement continuer une pratique des sciences, mais d'une autre façon, et surtout ne pas y accorder autant de temps⁵.

5. <https://www.youtube.com/watch?v=SU0V0C2Kd50>

Annexe A

Protocole de préparation du milieu WGP

Pour préparer 1L de solution WGP, à 900 mL d'eau filtrée Mili-Q sont ajoutés 50 mL de solution tampon 20X et 50 mL d'infusion WGP 20X. Le pH est ajusté à 7.0 puis la solution est autoclavée à 120°C pendant 20 min. La solution stérile est ensuite aliquotée sous hotte dans des tubes de 50 mL puis conservé à température ambiante à l'abri de la lumière.

Pour 1L d'infusion WGP 20X :

1. Ajouter 100 g de poudre d'herbe de blé (*Wheat Grass Powder*, Pines) à 800 mL d'eau filtrée Mili-Q dans un flacon en verre.
2. Faire bouillir pendant 15 min.
3. Filtrer la suspension à l'aide d'un filtre Büchner. Dans notre cas, nous utilisons une unité de filtration stérile à usage unique (Thermo Scientific Nalgene Rapid-Flow Sterile Disposable Filter Units with PES Membranes, 250 mL, Fisher Scientific).
4. Ajuster le volume à 1 L avec de l'eau filtrée Mili-Q.

Pour 1L de solution tampon 20X, préparée dans de l'eau filtrée Mili-Q sous agitation.

1. 15g de base Trizma
2. 4g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3. 15g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Annexe B

Protocole de "repiquage" des *Paramecium tetraurelia*

Matériels

Solutions

- β -sitosterol (4 mg/mL, préparé dans 100% d'éthanol).
Stocker dans l'obscurité à 4°C
- Milieu WGP 1X
- Tube de culture de *Paramecium tetraurelia*.

Equipements

- Micropipettes P2, P1000, P5000 et leurs cônes
- Tube 50 mL
- Bec Bunsen

Méthode

1. Nettoyer la surface de travail à l'alcool.
2. Présenter au plus proche du bec Bunsen les solutions ainsi qu'un tube 50 mL stérile.
Inscrire sur le tube le contenu et la date.
3. Allumer le bec Bunsen.
Travailler au voisinage de la flamme du bec Bunsen permet de rester dans une atmosphère semi-stérile.

148 ANNEXE B. PROTOCOLE DE "REPIQUAGE" DES *PARAMECIUM TETRAURELIA*

4. Débouchonner tous les tubes en présentant la partie interne du bouchon vers le haut et au plus proche du bec Bunsen pour minimiser les contaminations.
5. Passer rapidement le cône de la pipette 5 mL sous flamme puis injecter 5 mL de WGP dans le tube.
6. Passer rapidement le cône de la pipette 1 mL sous flamme, puis prélever 1 mL du tube de culture, au niveau de la surface et injecter dans le tube.
Les paramécies nageant naturellement vers le haut, c'est au niveau du ménisque qu'on trouvera une plus grande concentration de cellules.
7. Passer rapidement le cône de la pipette 2 μ L sous flamme puis prélever 1 μ L de β -sitosterol et injecter dans le tube.
8. Refermer tous les tubes et éteindre le bec Bunsen.

Refermer les tubes de culture lâchement pour permettre une circulation d'air.

Annexe C

Temps de contact des SE pour les mutants Pawn

Comme contrôle, nous avons utilisé *Paramecium tetraurelia* de type Pawn, un mutant qui ne peut pas exécuter d'AR dû à l'absence de canaux calciques voltage-dépendant dans les cils [98]. La fréquence d'AR moyenne mesurée par notre algorithme en l'absence de piliers pour les paramécies Pawn est de $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle \simeq 4,5 \cdot 10^{-3}$ Hz, soit environ 40 fois plus petit que pour les paramécies WT, $\langle f_{AR}^{\Phi=0} \rangle \simeq 0,165$ Hz. Cela met en évidence le faible taux de faux positifs de notre algorithme. En présence de piliers, les mutants Pawn ne peuvent ainsi exécuter ni SAR, ni OTAR et présentent au contact seulement des SE. Nous avons mesuré pour les Pawn, la même tendance pour le temps de contact moyen $\langle T(\theta_c) \rangle$, que pour les WT (Fig. C.1. Cela met en évidence le caractère purement passif des SE, même dans le cas de paramécies pouvant exécuter des AR.

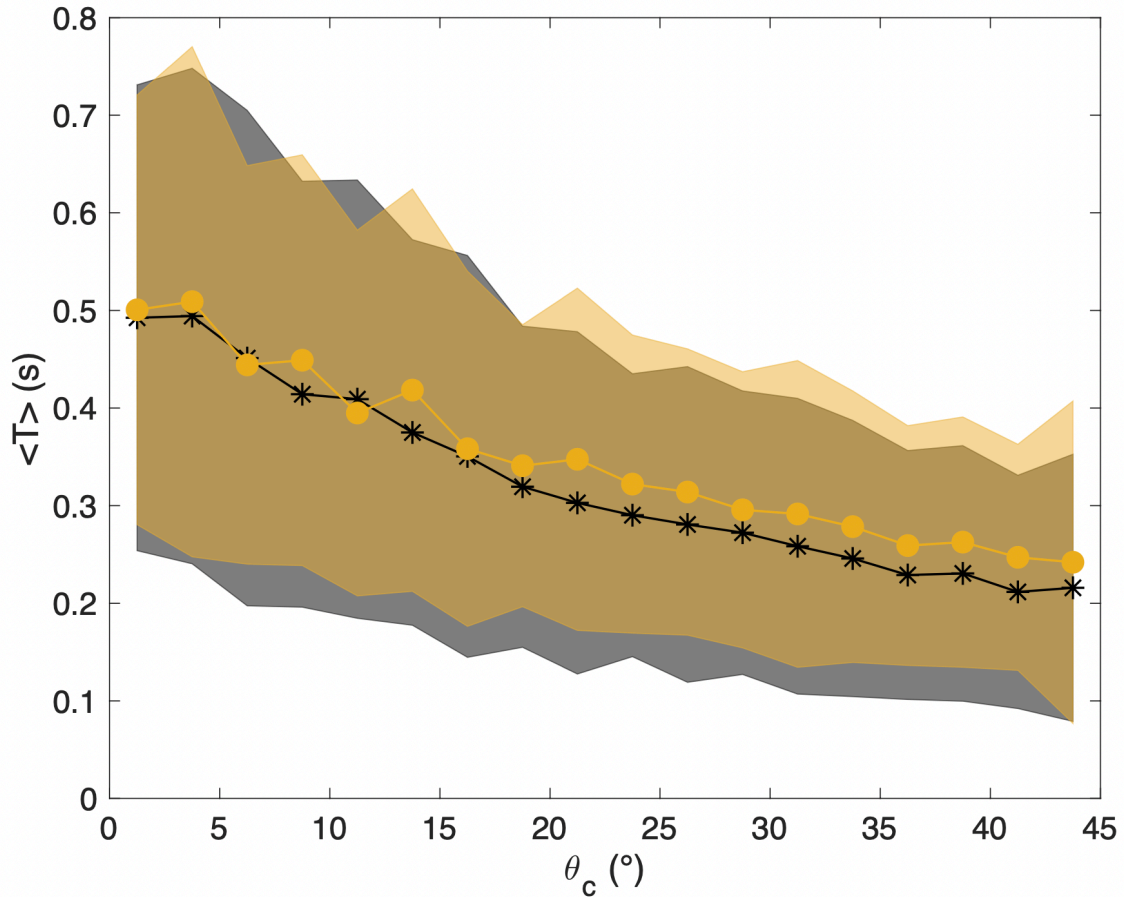


FIG. C.1 Temps de contact moyen $\langle T(\theta_c) \rangle$ pour les SE dans le cas de *Paramecium tetraurelia* WT (étoiles noires) ou Pawn (disques jaunes). Les données pour les Pawn proviennent d'expériences dans des environnements à obstacles distribués aléatoirement ($M = 7$ pour $\Phi = 0,083$, $M = 9$ pour $\Phi = 0,14$ et $M = 3$ pour $\Phi = 0,28$) donnant un total de 5274 SE. Dans le cas des paramécies WT, les données sont les mêmes que pour la Fig. 3.14C mais avec une taille de bin longue de $2,5 \mu\text{m}$. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne.

Annexe D

Simulations numériques : trajectoires typiques

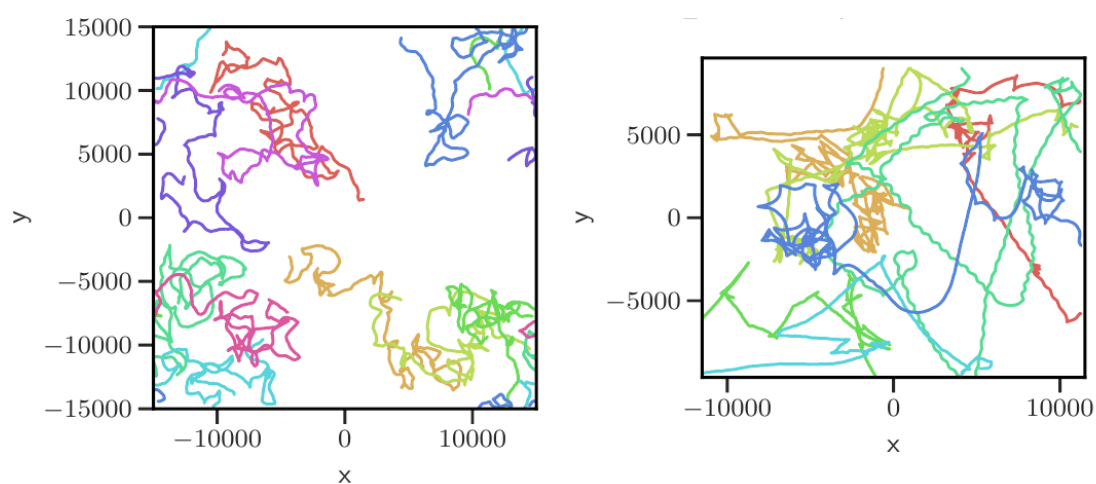


FIG. D.1 Trajectoires simulées (*gauche*) et expérimentales (*droite*) en l'absence d'obstacle, pour $\xi = 3, 0$. Comme ξ est grand, les "runs" simulées varient fortement en orientation entre les SAR, contrairement aux "runs" expérimentaux, plutôt droits.

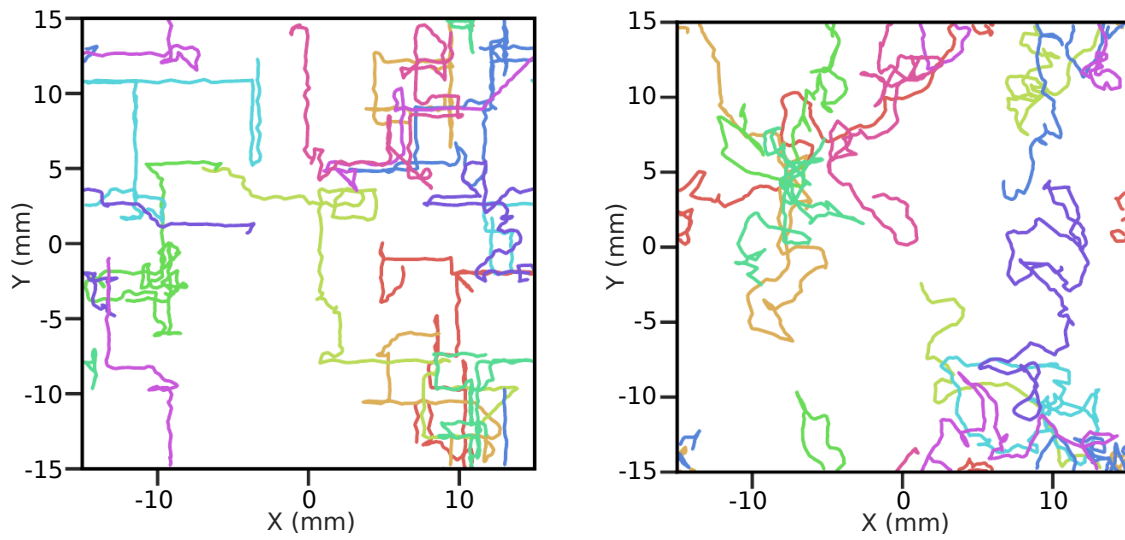


FIG. D.2 Effets de couloir. Trajectoires simulées de paramécies à fraction du surface d'obstacles $\Phi = 0,30$ en topologie carrée (gauche) et aléatoire (droite).

Annexe E

**Article : Interaction of the
mechanosensitive microswimmer
Paramecium with obstacles**

Interaction of the mechanosensitive microswimmer *Paramecium* with obstacles

Nicolas Escoubet,¹ Romain Brette,² Lea-Laetitia Pontani,^{1,*} and Alexis M. Prevost^{1,†}

¹*Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine,
Laboratoire Jean Perrin, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.*

²*Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France*

(Dated: December 19, 2022)

In this work, we report investigations of the swimming behavior of *Paramecium tetraurelia*, a unicellular microorganism, in micro-engineered pools that are decorated with thousands of cylindrical pillars. Two types of contact interactions are measured, either passive scattering of *Paramecium* along the obstacle or avoiding reactions, characterized by an initial backward swimming upon contact, followed by a reorientation before resuming forward motion. We find that avoiding reactions are only mechanically triggered about 10% of the time. In addition, we observe that only a third of all avoiding reactions triggered by contact are instantaneous while two thirds are delayed by about 150 ms. These measurements are consistent with a simple electrophysiological model of mechanotransduction composed of a strong transient current followed by a persistent one upon prolonged contact. This is in apparent contrast with previous electrophysiological measurements where immobilized cells were stimulated with thin probes, which showed instantaneous behavioral responses and no persistent current. Our findings highlight the importance of ecologically relevant approaches to unravel the motility of mechanosensitive microorganisms in complex environments.

I. INTRODUCTION

In their natural habitat, microorganisms evolve in complex environments that are characterized by the presence of obstacles with different shapes, sizes and mechanical properties. Therefore, foraging motile microorganisms have to swim efficiently in response to various stimuli such as chemical or light gradients. In this context, ciliated microorganisms have the ability to sense the properties of their environment through mechanosensitive processes [1–4]. *Paramecium* in particular is a large unicellular eukaryote organism (100 – 300 μm long) whose entire surface is covered with thousands of cilia that beat synchronously [5]. When it hits an obstacle, the mechanosensitive channels at its front open and trigger an avoiding reaction: *Paramecium* swims backwards for a short time, then reorients and swims forward in a new direction [6]. On the contrary, when *Paramecium* is poked on its posterior end, it displays an escape reaction during which it accelerates forward, a response that is elicited by a different type of mechanosensitive channel [3]. The behavior of *Paramecium* in complex environments is therefore dependent on its mechanosensitivity.

At the cellular level, it is known that a mechanical stimulation opens mechanosensitive channels located in the plasma membrane, which are specifically permeable to calcium [7–9]. The resulting inward calcium current depolarizes the membrane, which then opens voltage-gated calcium channels in the cilia, triggering an action potential and the reversal of the cilia [10, 11]. Mechanotransduction has been previously studied using electrophysiology experiments [2, 3]. However, in these experi-

ments, the mechanical stimulation was systematically applied with an external probe and not elicited upon swimming. Conversely, in behavioral studies, the swimming behavior of *Paramecium* in the presence of obstacles has been reported qualitatively but not systematically quantified [1], except for the special cases of microfluidic channels [12, 13], sliding along surfaces [14, 15] or during direct interactions between paramecia [16].

In this paper, we study the swimming behavior of *Paramecium* in controlled crowded environments and focus on its local interactions with obstacles. In recent years, similar approaches have been developed for a different microorganism, the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (*CR*), which swims through the synchronized beating of two front flagella. On long time scales, the presence of dense arrays has been shown to decrease the effective diffusivity of *CR* [17] or deflect their trajectories [18]. On short time scales, the local interactions of *CR* with either flat or curved surfaces have been studied and characterized through both contact and hydrodynamic modeling [19–21]. However, none of these studies has explicitly taken into account the mechanosensitive properties of the micro-swimmer in the modeling of their interactions with surfaces.

In our study, we distinguish between the hydrodynamic interactions and the contact regime that can lead to a mechanosensitive response. For interactions that do not lead to an avoiding reaction, we recover a behavior that has been reported previously for *CR* [20]: when *Paramecium* contacts a pillar, it is scattered with a fixed angle, while when it interacts without contact, its trajectory is linearly deflected. When an avoiding reaction is elicited upon contact, we show that the mechanosensitive behavior can be separated into two distinct responses: an avoiding reaction that is triggered immediately upon contact with the obstacle, and an avoiding reaction which is delayed. We then show that both responses can be

* lea-laetitia.pontani@sorbonne-universite.fr

† alexis.prevost@sorbonne-universite.fr

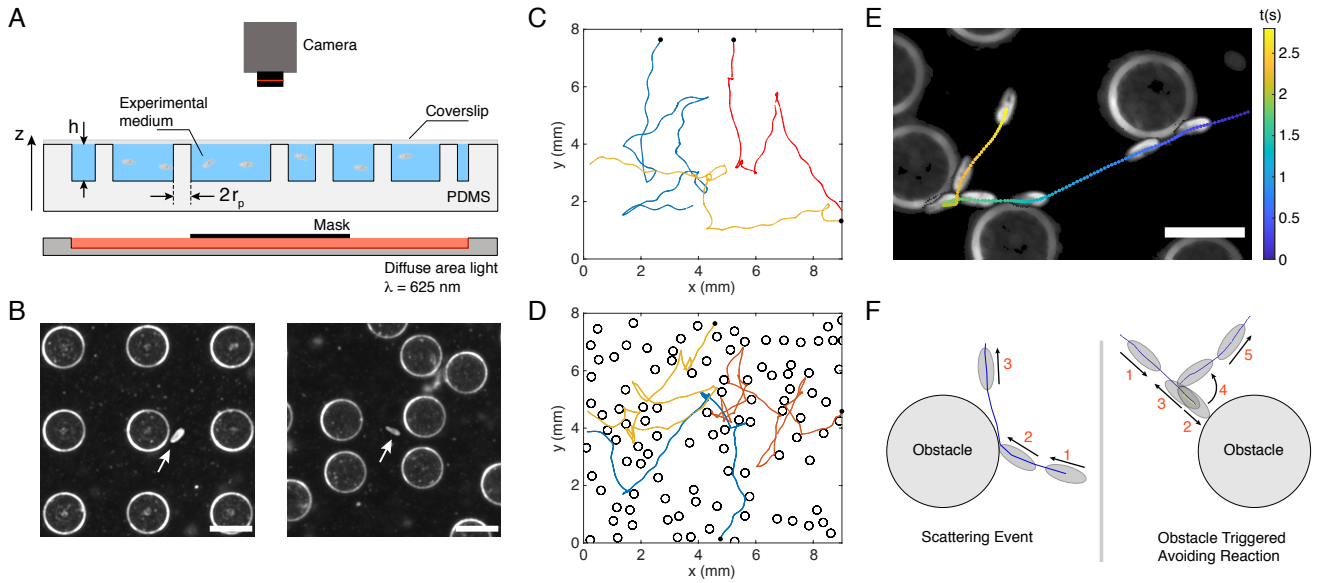


FIG. 1. Tracking *Paramecium* in micro-engineered environments. (A) Sketch of the experimental setup (*side view*). Paramecia are deposited in a PDMS elastomer pool filled with the experimental medium (see Materials and Methods) and decorated with cylindrical pillars (height $h = 340 \mu\text{m}$, diameter $2r_p \simeq 300 \mu\text{m}$). The pool is covered with a glass coverslip to prevent evaporation. Paramecia are illuminated in dark field with a red LED panel ($\lambda = 625 \text{ nm}$) and imaged from the top with a fast and sensitive camera. (B) Typical dark-field images of paramecia (white arrows) swimming in a square lattice (*left panel*, surface packing fraction $\Phi = 0.2$) and in a random lattice (*right panel*, $\Phi = 0.083$). The scale bar is $300 \mu\text{m}$ long. (C, D) 2D trajectories of 3 paramecia in a pool, (C) without obstacles and (D) with obstacles ($\Phi = 0.28$, random). For each trajectory, the black disk marks its starting point. (E) Composite image showing a close up view of the trajectory of a paramecium swimming in a random lattice of obstacles ($\Phi = 0.14$). The color of the trajectory codes for the elapsed time and a few successive positions of the same paramecium at different times are overlaid. The scale bar is $300 \mu\text{m}$ long. (F) Sketch of the two types of interactions with a pillar: (*left*) Scattering Event (SE), (*right*) Obstacle Triggered Avoiding Reaction event (OTAR). On both sketches, the black arrows indicate the direction of motion and the numbers the successive steps of the events.

accounted for by a simple model where a mechanotransduction current is integrated during contact until an excitability threshold is reached. The model accounts for all our observations, but in contrast to previous studies on immobilized cells stimulated by moving rods [3, 22], it predicts that with an ecological stimulus, the mechanotransduction current is small and has a persistent component.

II. RESULTS

A. Interactions with a pillar

Typical experiments consist in tracking *Paramecium tetraurelia* swimming in elastomer-based pools whose bottom is either smooth or decorated with cylindrical obstacles of radius $r_p \simeq 150 \mu\text{m}$, spatially distributed on random and square lattices with surface fractions Φ ranging from 0.011 to 0.28 (see Table 1, Materials and Methods and electronic supplementary material). As shown in Fig. 1A, the height of the pillars matches the depth of the pool $h = 340 \mu\text{m}$ and paramecia are thus constrained to the volume between the pillars and cannot swim above

square	0.083 (8)	0.14 (13)	0.20 (9)	0.28 (9)
random	0.011 (13)	0.083 (6)	0.14 (10)	0.28 (7)

TABLE I. Environments used in this work. The first column provides the lattice type. The other ones give the pillar surface fraction Φ and number M of experiments performed (brackets). In addition, 10 experiments were done without pillars ($\Phi = 0$) to observe the free swimming of the cells.

them. In addition, since the depth of the pool is about 3 times the length of *Paramecium*, the cells can swim helicoidally but their trajectories are mostly constrained in two dimensions. Some reorientation events associated with avoiding reactions can actually occur perpendicularly to the observation plane (in about 21% of the cases for $\phi = 0$, see electronic supplementary material for details). Figure 1B shows two examples of such micro-engineered pools (a square and a random lattice) imaged with a dark field illumination, so that both the edges of the pillars and paramecia appear as bright objects on a darker background (see white arrows on both images to locate the paramecia).

Without obstacles, the normal motion of *Paramecium* alternates between helicoidal swimming runs and sponta-

neous reorientations as shown in Fig. 1C with the example of three typical trajectories. These events have been coined “avoiding reactions” (*AR*) as they usually occur in response to different types of stimuli, such as a local change of temperature or the presence of attractants and/or repellents in the environment [1, 6]. During an *AR*, *Paramecium* comes to a stop, swims backward for a short period of time and then performs a 3D rotation of its body around its posterior end, before resuming its forward swimming motion in a new direction (see electronic supplementary material for the detailed dynamics of the *AR*, Section III, Fig. S3 and Movie S1). It results at long times in a motion (Fig. 1C) that is thus reminiscent of the classical *run and tumble* swimming dynamics of *E. Coli* bacteria [23].

As first reported by Jennings more than a century ago [1], an *AR* can also be triggered mechanically when *Paramecium* comes into direct contact with an obstacle, as depicted on the trajectories of Fig. 1D, obtained for paramecia swimming in a random network. In this case, the *AR* likely results directly from the opening of mechanosensitive channels located in the plasma membrane of *Paramecium*. However, contacts with an obstacle clearly do not only induce such triggered *AR*, but also lead to reorientation events during which *Paramecium* is “passively” scattered by the obstacle. Figure 1E shows a typical trajectory for which *Paramecium* first slides against two pillars at early and intermediate times (in blue), exhibiting passive-like scattering events (see electronic supplemental material, Section V, Fig. S4 and Movie S2), and then performs an *AR* upon hitting a third pillar (see the green to yellow colored points of the trajectory in Fig. 1E). For the rest of the manuscript, we will refer to the first two events of Fig. 1E as Scattering Events (or *SE*) and to the last one as an Obstacle Triggered Avoiding Reaction (or *OTAR*). Both types of events are sketched in Fig. 1F.

B. Passive interactions

How does *Paramecium* passively interact with an obstacle? To quantify this, we have followed the same approach as Kantsler *et al.* [19] and Contino *et al.* [20] by studying how the cells interact with a pillar depending on their incident angle, in the absence of any *AR*. For this purpose, we define an interaction corona as the circular region of radius $r_{int} = 256 \mu\text{m}$ and centered on the pillar, thus yielding a ring of width about one cell length around the pillar. We denote θ_i (*resp.* θ_o) the angle between the local radial direction and the orientation of the cell when it enters (*resp.* leaves) the interaction corona (Fig. 2A, inset).

We have measured θ_i and θ_o over $N = 28031$ passive interaction events, *i.e.* events during which the cell has traveled through the interaction corona without any *AR*, recorded from $M = 75$ independent experiments (Fig. 2A). Below a threshold incidence angle

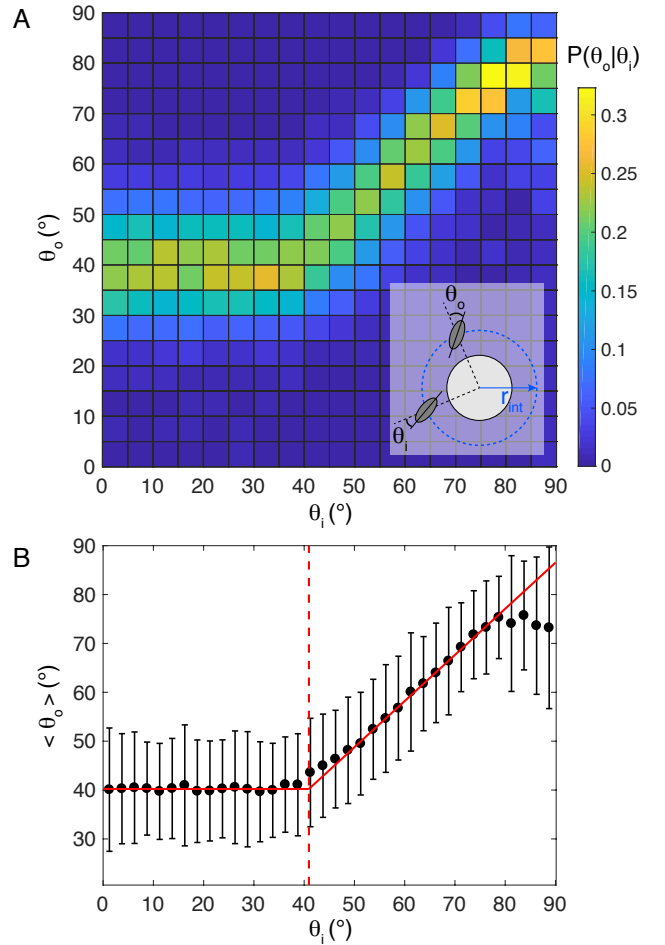


FIG. 2. Characterizing passive interactions. (A) Conditional probability $P(\theta_o|\theta_i)$ for θ_i and θ_o varying between 0° and 90° . Each square bin has a side length of 5° . This plot was obtained from $N = 28031$ events compiled from $M = 75$ independent experiments ranging from $\phi = 0.01$ to $\phi = 0.28$ in a square or random lattice. *Inset*: sketch to define the geometrical parameters. The blue dashed circle corresponds to the interaction corona while the solid black circle corresponds to the pillar. A paramecium intercepts the interaction corona with an angle θ_i and leaves it with the angle θ_o . (B) Mean output angle $\langle \theta_o \rangle$ versus θ_i , where θ_i is taken as the center value of each bin, of width 2.5° . Solid red lines are linear fits of the contact and hydrodynamic regimes, that intercept at $\tilde{\theta}_i = 41^\circ$, marked by the vertical red dashed line. In the hydrodynamic regime, the linear fit yields, for $\theta_i \in [50^\circ, 80^\circ]$, a slope $m = 0.94 \pm 0.031$ and intercept $q = 1.6 \pm 2.0^\circ$ with $R^2 = 0.99$.

$\tilde{\theta}_i = 41^\circ \pm 3.7^\circ$, cells always leave the pillars with the same mean angle $\langle \hat{\theta}_o \rangle \approx 40^\circ \pm 0.22^\circ$. In this case, there is no memory of the in-going angle θ_i . Above $\tilde{\theta}_i$, the cell travels through the interaction corona without actually contacting the pillar. In that regime, its trajectory is simply deflected and the mean angle $\langle \theta_o \rangle$ depends linearly on θ_i with a slope $m = 0.94 \pm 0.031$ (Fig. 2B). The

measured value of $\tilde{\theta}_i$ matches a simple geometric prediction, based on a tangent contact of the cell with the pillar, $\tilde{\theta}_i = \arcsin((r_p + b)/r_{int}) = 42^\circ \pm 1.3^\circ$ with the semi-width of the cell $b = 29.5 \pm 4.4 \mu\text{m}$.

The measurements for the contact regime are coherent with our observations that upon contact, the cell first reorients and aligns along the pillar, then slides against it before leaving tangentially to the pillar, independently of the in-going angle. Finally, the conditional probability map $P(\theta_o|\theta_i)$ found for *Paramecium* is very similar to the one measured by Contino *et al.* [20] with the biflagellate microalga *CR*, suggesting a universal behavior at contact among microswimmers, independently of their swimming mode. In the following, we will focus exclusively on the interactions during which the cell collides mechanically with the obstacle and we will thus not consider the hydrodynamic regime.

C. Obstacle triggered avoiding reactions

Although it is well known that mechanical stimulation of the front part of *Paramecium* can trigger an AR [1, 24], it is unclear how ARs are elicited upon contact on larger obstacles such as our pillars, and at the swimming speed of *Paramecium* itself. We first ensured that ARs in the vicinity of obstacles were indeed triggered by the mechanical contact with the obstacle, *i.e.* that they are OTARs and not spontaneous ARs happening close to it by chance. To do so, we looked at the radial dependence of the AR frequency $f_{AR}(r)$ defined as

$$f_{AR}(r) = \frac{n_{AR}(r \pm dr/2)}{T_{obs}(r \pm dr/2)}, \quad (1)$$

where n_{AR} is the total number of AR in the annulus of width dr at position r , and T_{obs} is the total observation time of cells in this annulus (see inset in Fig. 3).

Figure 3 shows $\langle f_{AR}(r) \rangle$ plotted as a function of the distance from the surface of the pillar $r - r^*$, with $r^* = r_p + b \sim 172 \mu\text{m}$ the inaccessible volume radius, and where the brackets denote an averaging over $M = 13$ independent experiments. In the immediate vicinity of a pillar, one clearly sees that the spatial AR frequency increases by a factor of about 4 compared to its value far from the pillar, peaking at r^* . Such an increase is a clear signature of a mechanosensitive response. In addition, far from the pillar, one recovers the mean value of the spontaneous AR frequency measured in pillar-free environments, $\langle f_{AR}^{\phi=0} \rangle \simeq 0.165 \text{ Hz}$.

Direct visual inspection of paramecia swimming against pillars reveals that not all OTAR are actually triggered instantaneously upon contact (see electronic supplemental material, Movies S3 and S4). To quantify this effect, we have measured the duration between the collision time and the start of the backward swimming that marks the beginning of an OTAR (see electronic supplemental material and Materials and Methods for the

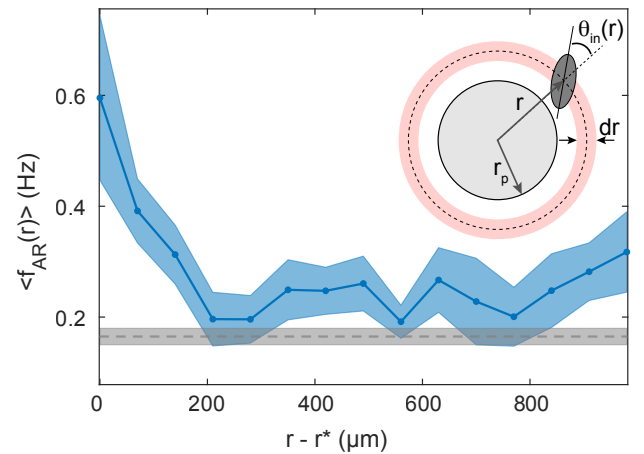


FIG. 3. Detecting ARs in the vicinity of a pillar. Average AR frequency $\langle f_{AR}(r) \rangle$ at a distance $r - r^*$ from the surface of the pillar. The blue curve is obtained by averaging $f_{AR}(r)$ from $M = 13$ independent experiments and the blue shaded area corresponds to the standard error of the mean (SEM). The experiments were performed in a randomly distributed pillar array with $\Phi = 0.01$. The horizontal gray dashed line corresponds to the mean avoiding reaction frequency $\langle f_{AR}^{\phi=0} \rangle = 0.165 \text{ Hz}$ in the absence of obstacles and computed over $M = 10$ independent experiments, and the gray shaded area gives the SEM. Inset: sketch to illustrate the geometrical parameters. For these measurements, a bin size $dr = 70 \mu\text{m}$ was chosen, that matches the average semi-width of a cell.

determination of both times). This duration, noted τ , is called the triggering time. Figure 4A shows the distribution of τ obtained with a total of $N = 1790$ OTARs. This distribution has two peaks, a first narrow one at $\tau \approx 0 \text{ s}$ and a second broader one at $\tau \approx 0.15 \text{ s}$. Thus, *Paramecium* displays two types of reactions: an immediate one, referred to as an *instantaneous OTAR* ($\tau \in [0, 0.04] \text{ s}$), and a delayed one, called *delayed OTAR* ($\tau \in]0.04, 0.6] \text{ s}$).

Furthermore, we find that the probability of an instantaneous OTAR does not depend on the contact angle θ_c (defined as the incident angle θ_{in} at contact, see inset of Fig. 3 and Materials and Methods), while the probability of a delayed OTAR decreases with increasing θ_c (Fig. 4B). We present below an electrophysiology-based model that accounts for these two distinct responses.

D. A simple model

How can *Paramecium* display two different types of behavior upon contact, with a different dependence on the incidence angle? Electrophysiological studies on immobilized cells show that a mechanical stimulation of the front membrane triggers an inward calcium current with short latency and duration, in the millisecond range [3, 22]. This transient current then depolarizes the membrane and quickly triggers an action potential, initiating the

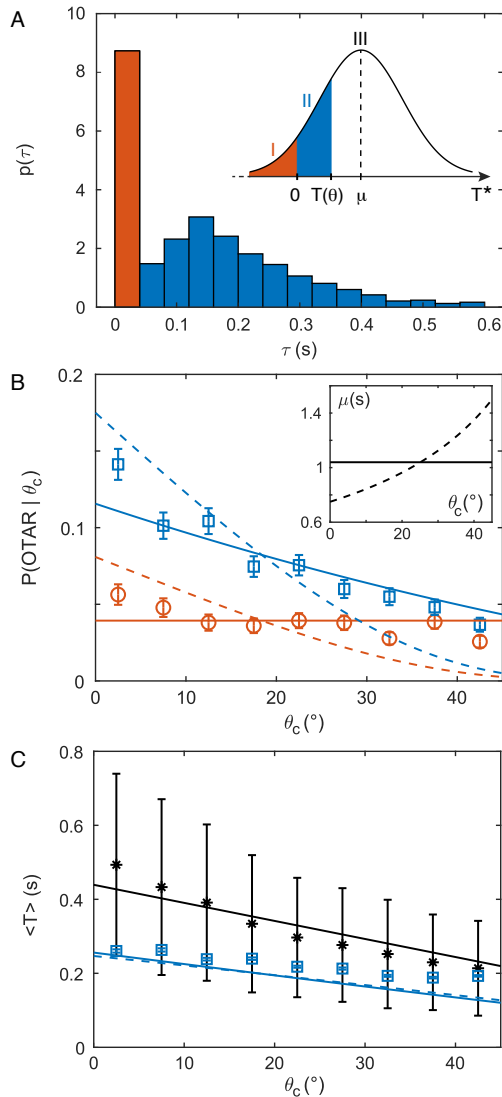


FIG. 4. Identification and modeling of two types of OTARs. (A) Probability density function of the measured triggering time τ with a bin width of 2 frames. Red and blue bars correspond respectively to instantaneous and delayed OTARs. Inset: sketch of the model distribution of T^* with mean μ , along with the three modes. (B) Probability of doing an instantaneous (red circles) or a delayed (blue squares) OTAR given the collision angle θ_c , as a function of θ_c with a bin width $\Delta\theta_c = 5^\circ$ (see Materials and Methods for the error bar calculation). The solid (resp. dashed) line is for the uniform (resp. non-uniform) model with constant μ (resp. $\mu(\theta_c) = c/(90 - \theta_c)$). Inset: mean μ of the triggering time T^* as a function of θ_c for the uniform response model (solid line) and non-uniform response model (dashed line). (C) Average contact duration $\langle T(\theta_c) \rangle$ for SEs (black stars) and for delayed OTARs (blue squares). The solid black line is a linear fit of the SE data using equation (2), yielding $T_{max} = 0.44$ s (with $R^2 = 0.87$). The solid (resp. dashed) blue line corresponds to the prediction of contact duration in the case of delayed OTARs, with constant μ (resp. depending on θ_c).

avoiding reaction. Given this evidence, the observation of OTARs delayed by several hundreds of milliseconds is surprising. We propose here a simple model to explain both types of reactions. First, given that most contacts do not trigger an avoiding reaction, we postulate that the current triggered upon contact is smaller than in typical mechanical stimulations of immobilized cells. To trigger an action potential, the charge Q transmitted at contact must exceed a threshold $Q^* \approx CV^*$, where $C \approx 300$ pF is the membrane capacitance [11] and $V^* \approx 3$ mV is the threshold potential to trigger an action potential relative to the initial potential, which quantifies cell excitability [25]. Thus, $Q^* \approx 1$ pC. Depending on the cell excitability at the instant of contact, the transmitted charge may or may not trigger an action potential.

Second, to account for the delayed reactions, we postulate that, in addition to the instantaneously transmitted charge, there is a small transduction current I_0 that persists as long as the cell is in contact with the pillar. This could be due to an incomplete inactivation of the mechanosensitive channels, as observed in patch clamp recordings of *Piezo* channels [26], or to the progressive recruitment of mechanosensitive channels during sliding, as different parts of the membrane come into contact with the pillar. Therefore, during contact, a transmitted charge $Q + I_0T$ accumulates during a time T until it reaches the threshold Q^* or the cell leaves the pillar. Thus, an avoiding reaction is triggered if the cell remains in contact for a minimum duration $T^* = (Q^* - Q)/I_0$. We assume that T^* is a random variable normally distributed with probability density p , mean μ and standard deviation σ . This would occur for example if the membrane potential (which is noisy [27]) was normally distributed. Thus, we can see that three cases can occur: (i) for $T^* \leq 0$, a contact instantaneously triggers an avoiding reaction: this is an instantaneous OTAR; (ii) the cell stays in contact for a time T^* , then does an avoiding reaction: this is a delayed OTAR; (iii) the cell leaves the obstacle before time T^* : this is a scattering event SE.

To quantify the probability of each case, we first measured the duration $T(\theta_c)$ of a SE as a function of the contact angle θ_c (Fig. 4C, black stars). If we assume, as our observations suggest, that the cell slides on the pillar until it leaves it tangentially, then this duration should depend approximately linearly on θ_c as follows:

$$T(\theta_c) = T_{max}(1 - \theta_c/90) \quad (2)$$

Fitting this expression to our data (Fig. 4C, black solid line) yields $T_{max} = 0.44 \pm 0.035$ s (95% confidence bounds, $R^2 = 0.87$). Note that the same trend for $T(\theta_c)$ was measured for *Pawn* cells, a mutant of *Paramecium tetraurelia*, which cannot perform ARs due to a lack of voltage-gated calcium channels in the cilia [28] (see electronic supplementary material, Section VIII, Fig. S7). This confirms the passive nature of SEs.

We can now express the probability of each of the three cases (Fig. 4A, inset).

Case 1: An instantaneous *OTAR* occurs with probability

$$P_1 = \int_{-\infty}^0 p(T^*) dT^* \quad (3)$$

Case 2: A delayed *OTAR* occurs with probability

$$P_2(\theta_c) = \int_0^{T(\theta_c)} p(T^*) dT^* \quad (4)$$

Case 3: A *SE* occurs with probability

$$P_{SE}(\theta_c) = \int_{T(\theta_c)}^{+\infty} p(T^*) dT^* \quad (5)$$

The model has two free parameters, μ and σ , which we constrain with two experimental data points, $P_1(\theta_c = 22.5^\circ)$ and $P_2(\theta_c = 22.5^\circ)$. We find $\mu \approx 1.04$ s and $\sigma \approx 0.59$ s, which means that it takes on average about 1 s for a contact to trigger an avoiding reaction.

The model predicts that the probability of an instantaneous *OTAR* does not depend on θ_c , in agreement with our observations (Fig. 4B, red solid line), because the transduction current is assumed to be independent of the contact position. Less intuitively, the model also predicts that the probability of a delayed *OTAR* decreases with increasing θ_c , because contacts with smaller θ_c are longer. This angular dependence is in quantitative agreement with our observations (Fig. 4B, blue solid line).

Electrophysiological studies show that the transduction current vanishes in the middle of the cell ($\theta_c = 90^\circ$) (and reverts on the posterior side) [29]. What would happen if it decreased gradually over the anterior part with increasing θ_c ? We calculate the probabilities of the three cases with an angular dependence of the mean of T^* , as follows:

$$\mu(\theta_c) = \frac{c}{90 - \theta_c} \quad (6)$$

where the constant c is chosen such that the angular average $\langle \mu(\theta_c) \rangle$ equals the mean of T^* in the uniform model (Fig. 4B, inset). Here, the triggering time T^* is minimum at $\theta_c = 0^\circ$ and infinite at $\theta_c = 90^\circ$. With this model, we find that the probabilities of both instantaneous and delayed *OTARs* vary substantially with the contact angle θ_c , unlike in the observations (Fig. 4B, red and blue dashed lines).

Finally, the model allows predicting the mean contact duration of delayed *OTARs* as a function of θ_c , which is

$$T_2(\theta_c) = \mathbb{E}[T^* | 0 < T^* < T(\theta_c)] = \frac{\int_0^{T(\theta_c)} T^* p(T^*) dT^*}{\int_0^{T(\theta_c)} p(T^*) dT^*} \quad (7)$$

The prediction is in quantitative agreement with the observations (Fig. 4C, blue solid and dashed lines). These values are in the range of the measured secondary peak of the distribution of the triggering times τ (Fig. 4A). Even though the mean charging time is about 1 s, the triggering time is in fact limited by the maximum sliding duration against the pillars (about 0.3 s, Fig. 4C, blue squares).

III. DISCUSSION

Motile microorganisms naturally evolve in complex environments that they have to sense and react to [30]. It is therefore critical to understand how their foraging efficiency depends on their local interactions with obstacles found in their natural habitat. In order to answer these questions, a large array of literature has been dedicated to the study of motility in engineered complex environments in the past years [17, 20, 21, 31].

In this context, *Paramecium* is interesting as it can be studied both through behavioral and electrophysiology approaches thanks to its large size. As a matter of fact, its swimming behavior as well as its mechanosensitive response, have been extensively described in past literature, reviewed in [6]. The main message from these studies is that *Paramecium* performs an avoiding reaction upon collision with an obstacle, through a mechanosensitive response, and this response is modulated by the location of the stimulation on the surface of the swimmer. However, our work reveals a different picture for the behavior of this microorganism in our experimental conditions.

First of all, collision with an obstacle does not necessarily elicit an avoiding reaction. In fact, it is passively scattered on the surface of the pillars 90% of the time, which means that its trajectory is deflected without exhibiting any backwards swimming. In this case, the scattering event imposes the angle θ_o at which the swimmer escapes the immediate neighborhood of the pillar. Conversely, when *Paramecium* interacts hydrodynamically with the pillar, this angle θ_o depends linearly on the incident angle θ_i . In the absence of an avoiding reaction, our findings directly echo previous observations on a different microorganism [20], the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.

The fact that only 10% of the contact events lead to an avoiding reaction is surprising. Actually, a similar small rate of avoiding reactions (of less than 5%) has been reported by Ishikawa *et al.* [16], although in a different context that involves collisions between two freely swimming paramecia. Apart from this particular case, such an observation has not been quantified in previous behavioral experiments of freely swimming paramecia, which were done more than a century ago [1]. Electrophysiological studies on immobilized cells on the other hand, did not suggest however such a low rate of mechanical reactions [3, 8, 9, 22]. This may be due simply to the fact that

mechanical stimulation with probes was adjusted precisely so as to induce a measurable mechanosensitive response (see in particular Fig. 3 in [3]). To our knowledge, all electrophysiological studies on the mechanotransduction of *Paramecium* used micrometer-sized glass probes, and it could well be that the applied force were much stronger than in our experiments, especially as our obstacles are much wider than typical probes.

From a behavioral perspective, it is intriguing that avoiding reactions are relatively rare when *Paramecium* hits large obstacles such as our pillars. One possible explanation is that it might not be critical for the organism to react to a large obstacle when it can be passed by sliding. This would explain the occurrence of delayed reactions: an avoiding reaction is triggered when the organism is blocked by the obstacle for a certain amount of time. Another possibility could be that mechanosensitivity serves not simply navigation in crowded environments, but also and perhaps primarily the avoidance of sharp objects that may harm the membrane, as is suggested by evolutionary accounts [32].

Another surprising finding is that many OTARs are delayed by about 150 ms, when electrophysiological studies report nearly instantaneous responses. According to voltage clamp measurements, mechanotransduction currents activate with a very short latency and a rise time smaller than 20 ms, in *Paramecium* and other ciliates [8]. In addition, the current appears to be transient. There are two possibilities to make our findings consistent with these previous studies. One is that the current inactivates only partially. Indeed, this is what has been observed in Piezo channels with a constant applied pressure [26]. Previous studies in *Paramecium* quantified the peak current but not its stationary value. Another possibility is that, as the organism slides along the obstacle, additional mechanosensitive channels are recruited.

Finally, another noticeable discrepancy with previous work is the distribution of mechanosensitivity along the body of *Paramecium*. While our experimental data is in agreement with a homogeneous distribution of mechanosensitivity along the front part of *Paramecium*, previous electrophysiological studies showed graded responses along the body axis [22]. Stimulating the anterior part triggers an inward current, carried mostly by calcium, while stimulating the posterior part triggers an outward current, carried by potassium. In the middle, the transduction current vanishes. When potassium channels are blocked pharmacologically, mechanical stimulation triggers a uniform depolarizing response across the body [3]. Thus, the spatial gradient of mechanosensitivity appears to be due to the cancellation of a spatially uniform depolarizing mechanoreceptor current by a spatially graded hyperpolarizing current. It is not entirely clear from previous measurements whether this cancellation is linear between the anterior and posterior end, and this is complicated by experimental difficulties. Indeed, immobilized cells were mechanically stimulated with a glass probe of fixed orientation, and with a fixed move-

ment, while position along the membrane was varied. Thus, the orientation and direction relative to the membrane surface varied, and the amplitude of the membrane deflection was not fixed either. In contrast, in our experiments, the obstacles are very controlled in their shape and mechanical properties. Therefore the contact only depends on the swimming behavior of *Paramecium* itself. Moreover, it is unclear how the presence of electrophysiology micropipettes inside the organism and its immobilization might affect its mechanical properties. For instance, the presence of a pipette might impose a prestress on the cell surface. In fact, in artificial mechanoreceptors, wetting of the membrane on a pipette is sufficient to trigger the opening of mechanosensitive channels [33].

In the future, observing electrophysiological responses of swimming organisms to obstacles should therefore be key to unify findings obtained from electrophysiology and behavioral experiments.

IV. MATERIALS AND METHODS

A. Cell culture and preparation

Experiments were performed with the wild-type stock 51 of *Paramecium tetraurelia*, obtained from Eric Meyer, Institut de Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris, France. The cells were cultured in a fully opaque incubator set at 27°C in a buffered infusion of wheat grass powder (Wheat Grass Powder, Pines) complemented with 0.8 µg/mL β-sitosterol and inoculated with non-pathogenic *Klebsiella pneumoniae* as a food source. After 48 h of growth and at least 20 min before an experiment, about 0.4 mL of cell suspension were pipetted from the surface of the culture medium into 4 mL of an inorganic medium (1 mM CaCl₂, 4 mM KCl and 1 mM Tris HCl, pH 7.2). As a control, experiments with the *Pawn* mutant strain, which cannot perform ARs due to a lack of voltage-gated calcium channels in the cilia [28], were also performed. The same culture and preparation protocols were carried out.

B. Fabrication of the pools

Pools were manufactured using a combination of micro-milling and elastomer molding techniques fully described in the electronic supplementary material, Section I and in Fig. S1. They are made of a polydimethylsiloxane elastomer (PDMS; Sylgard 184, Dow Corning; cross-linking ratio 10:1, Young's modulus $E \simeq 2.7 \pm 0.8$ MPa) and consist of a square wall of height $h = 340$ µm and edge length 30 mm that delimits an accessible volume. Its surface is either bare or decorated with cylindrical pillars of radius $r_p = 142.5$ µm, distributed according to a square lattice or randomly. For the square lattice, the surface fraction $\Phi = \pi r_p^2 / s^2$ is varied by changing

the mesh size s . For the random lattices, pillars are distributed randomly with a minimal spacing of $\simeq 60 \mu\text{m}$ to avoid trapping of the cells. Prior to an experiment, the elastomer pool was exposed to an oxygen plasma for about 1 min to render the PDMS surface hydrophilic. After injecting the cells, the pool was closed with a glass coverslip in contact with the top of the wall and the pillars.

C. Experimental setup and imaging

Cells were imaged from the top with a variable zoom lens (MVL12X12Z, Thorlabs) set on 1.5x combined with a 1.33x extension tube (Thorlabs, MVL133A) yielding a pixel size of $3.81 \pm 0.01 \mu\text{m}$. Images were captured with a high resolution and sensitive CMOS camera (Blackfly S BFS-U3-51S5M-C, Flir, USA, 2448×2048 pixels², 10 bits) operating at 50 fps, using its dedicated acquisition software *SpinView*. To enhance contrast, the pool was illuminated in a dark field configuration using a square LED panel (EFFI-SBL, Efflux, France) as a light source, producing a red light ($\lambda = 625 \text{ nm}$) to minimize phototaxis [34].

D. Image processing and analysis

Raw images were directly recorded to a hard drive and compressed by first removing the background then applying a threshold [11]. Automatic tracking was performed on compressed images using *FastTrack* [35]. To maximize tracking quality, tracked movies were then visually inspected and the few remaining errors were manually corrected using the embedded post-processing tools of the *FastTrack* program. At each time t , the cell contour was fitted by an ellipse whose orientation $\theta(t)$, defined as the angle between the major axis of the ellipse and the horizontal axis x of the images (see Fig. 1C,D and electronic supplementary material, Section II, Fig. S2), was computed from the asymmetry of the pixel histogram along the major axis. The semi-major and semi-minor axes were estimated at $a = 68.5 \pm 7.7 \mu\text{m}$ and $b = 29.5 \pm 4.4 \mu\text{m}$, respectively (average \pm std, $N = 5080$ trajectories).

E. Post-processing

A *Matlab* (Mathworks Inc. USA) script was used to remove trajectories shorter than 1s and time intervals during which the object was immobile. Another *Matlab* script was used to remove trajectories that presented circling motions, based on a measure of the sign of the instantaneous angular velocity $\dot{\theta}(t) = (\theta(t + \Delta t) - \theta(t)) / \Delta t$ with $\Delta t = 20 \text{ ms}$, the time interval between frames.

F. Detection of avoiding reactions

In our analysis, an avoiding reaction (*AR*) is described as a two-step process: a backward swimming (*BS*) followed by a reorientation. The *BS* was detected when the instantaneous motion vector $\mathbf{m}(t)$ and the orientation vector $\mathbf{o}(t)$ (posterior to anterior) pointed to opposite directions, *i.e.* $\mathbf{m}(t) \cdot \mathbf{o}(t) < 0$. *BS* events consisting of a single frame were discarded. The reorientation event was identified as the time interval during which the instantaneous angular speed was large enough, *i.e.* $|\dot{\theta}(t)| = |\omega(t)| > \omega_{thr} = 150^\circ/\text{s}$ (see electronic supplementary material, Section III and Fig. S3).

G. Detection of mechanical contacts

We defined a contact corona of radius $r_c = r_p + \delta r$ where $\delta r = 19 \mu\text{m}$ was chosen using physical arguments and visual inspections (see electronic supplementary material for details, Section VI and Fig. S5A). This sets a contact interaction interval $[t_{rc}^i, t_{rc}^f] = \{t \in [t_i, t_o] \mid r_{min}(t) < r_c\}$, where $r_{min}(t)$ is the distance between the center of the pillar and the ellipse that fits the cell at time t , and where t_i (*resp.* t_o) is the time at which the cell center enters (*resp.* leaves) the interaction corona. We considered that the cell collided with the obstacle if and only if its incident angle θ_{in} when entering the contact corona was smaller than a threshold, namely $\theta_{in}(t_{rc}^i) < \theta_{rc}^*$, where the contact angle threshold is defined in the same way as for θ_i^* but at t_{rc}^i (see electronic supplementary material for details, Section VI and Fig. S5B,C). In this case, the collision time t_c^i was defined as the first velocity minimum within the contact interaction interval $[t_{rc}^i, t_{rc}^f]$ defined above. The interaction was categorized as a *SE* if no *AR* was triggered within the contact corona. In this case, the end of a contact was defined as the first time at which the cell is tangent to the obstacle, *i.e.* $t_c^f = \min\{t \in [t_{rc}^i, t_{rc}^f] \mid \theta_{in}(t) = 90^\circ\}$. An *AR* triggered within the contact corona may be an *OTAR*, or a spontaneous *AR* occurring shortly after a *SE*. We used the latency of the *AR* to determine more finely whether this was an *OTAR* or a *SE* (see electronic supplementary material, Section VII and Fig. S6). If it was categorized as an *OTAR*, the end of the contact was the starting time of the avoiding reaction. Applying this procedure over all environments allowed us to identify a total of $N_{SE} = 15601$ *SEs*, $N_{inst} = 670$ instantaneous *OTARs* ($\tau \leq 40 \text{ ms}$) and $N_{delayed} = 1120$ delayed *OTARs* ($\tau > 40 \text{ ms}$).

H. Error estimation of the conditional *OTAR* probability

We denote by n_{inst} the number of instantaneous *OTARs* with collision angle $\theta_c \pm d\theta_c$ and n_c the total number of collisions with $\theta_c \pm d\theta_c$. Then, the number of

instantaneous *OTARs* can be modeled as n_c draws of a binomial distribution of parameter $p = n_{inst}/n_c$ and variance $mp(1-p)$. Thus, the conditional probability $p = P(OTAR|\theta_c)$ represented in Fig. 4B can be estimated as n_{inst}/n_c and its error is given by $\sqrt{n_cp(1-p)/n_c}$. The same estimation was applied for delayed *OTARs*.

I. Numerical computations

Data analysis and numerical computations were done with *Matlab*. The contact duration $T(\theta_c)$ was fitted using the Curve Fitting Toolbox with the Nonlinear Least Square method. The set of non-linear equations for P_1 and $P_2(\theta_c)$, *i.e.* equations (3) and (4), was solved using the function *fsolve.m*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge financial support from CNRS (MITI, Défi Mécanobiologie, Project PERCÉE), Sorbonne Université (Émergence-Project NEUROSWIM), Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE30-0025-01 and ANR-21-CE16-0013-02), Programme Investissements d’Avenir IHU FORE-SIGHT (Grant ANR-18-IAHU-01) and Fondation Pour l’Audition (Grant FPA RD-2017-2). The authors thank Eric Meyer for providing us with the wild-type of *Paramecium tetraurelia* and for insightful discussions. The authors also thank Mireille Betermier and Anne-Marie Tassin for providing us with the *Pawn* mutant of *Paramecium tetraurelia*. Finally, the authors thank Georges Debrégeas and Anke Lindner for fruitful discussions.

-
- [1] H. S. Jennings, *Behavior of the lower organisms*, 10 (Columbia University Press, 1906).
 - [2] Y. Naitoh and R. Eckert, *Science* **164**, 963 (1969).
 - [3] Y. Satow, A. Don Murphy, and C. Kung, *Journal of Experimental Biology* **103**, 253 (1983).
 - [4] K. Fujiu, Y. Nakayama, H. Iida, M. Sokabe, and K. Yoshimura, *Nature Cell Biology* **13**, 630 (2011).
 - [5] J. Elgeti and G. Gompper, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 4470 (2013).
 - [6] R. Brette, *Eneuro* **8** (2021).
 - [7] Y. Naitoh, in *Membranes and Sensory Transduction*, edited by G. Colombetti and F. Lenzi (Springer US, Boston, MA, 1984) pp. 113–135.
 - [8] H. Machemer and J. W. Deitmer, in *Progress in Sensory Physiology*, *Progress in Sensory Physiology*, edited by H. Autrum, D. Ottoson, E. R. Perl, R. F. Schmidt, H. Shimazu, and W. D. Willis (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1985) pp. 81–118.
 - [9] H. Machemer, in *Sensory Perception and Transduction in Aneural Organisms*, NATO ASI Series, edited by G. Colombetti, F. Lenzi, and P.-S. Song (Springer US, 1985) pp. 179–209.
 - [10] R. Eckert, *Science* **176**, 473 (1972).
 - [11] I. Elices, A. Kulkarni, N. Escoubet, L.-L. Pontani, A. M. Prevost, and R. Brette, *bioRxiv* (2022), 10.1101/2022.02.15.480485.
 - [12] S. Jana, A. Eddins, C. Spoon, and S. Jung, *Scientific Reports* **5**, 1 (2015).
 - [13] I. Kunita, S. Kuroda, K. Ohki, and T. Nakagaki, *Frontiers in Microbiology* **5**, 270 (2014).
 - [14] Y. Nishigami, T. Ohmura, A. Taniguchi, S. Nonaka, J. Manabe, T. Ishikawa, and M. Ichikawa, *Communicative & Integrative Biology* **11**, e1506666 (2018).
 - [15] T. Ohmura, Y. Nishigami, A. Taniguchi, S. Nonaka, J. Manabe, T. Ishikawa, and M. Ichikawa, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 3231 (2018).
 - [16] T. Ishikawa and M. Hota, *Journal of Experimental Biology* **209**, 4452 (2006).
 - [17] M. Brun-Cosme-Bruny, E. Bertin, B. Coasne, P. Peyla, and S. Rafai, *The Journal of Chemical Physics* **150**, 104901 (2019).
 - [18] M. Brun-Cosme-Bruny, A. Förtsch, W. Zimmermann, E. Bertin, P. Peyla, and S. Rafai, *Physical Review Fluids* **5**, 093302 (2020).
 - [19] V. Kantsler, J. Dunkel, M. Polin, and R. E. Goldstein, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 1187 (2013).
 - [20] M. Contino, E. Lushi, I. Tuval, V. Kantsler, and M. Polin, *Physical Review Letters* **115**, 258102 (2015).
 - [21] A. Théry, Y. Wang, M. Dvoriashyna, C. Eloy, F. Elias, and E. Lauga, *Soft Matter* **17**, 4857 (2021).
 - [22] O. A and M. H, *Journal of Comparative Physiology* **135**, 233 (1980).
 - [23] H. C. Berg, *Nature* **254**, 389 (1975).
 - [24] R. Eckert, Y. Naitoh, and K. Friedman, *The Journal of Experimental Biology* **56**, 683 (1972).
 - [25] H. Machemer and R. Eckert, *Journal of Comparative Physiology* **104**, 247 (1975).
 - [26] B. Coste, J. Mathur, M. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, A. E. Dubin, and A. Patapoutian, *Science* **330**, 55 (2010).
 - [27] W. H. Moolenaar, J. De Goede, and A. A. Verveen, *Nature* **260**, 344 (1976).
 - [28] S. Lodh, J. Yano, M. S. Valentine, and J. L. Van Houten, *Journal of Experimental Biology* **219**, 3028 (2016).
 - [29] A. Ogura and K. Takahashi, *Nature* **264**, 170 (1976).
 - [30] K. Y. Wan and G. Jékely, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **376**, 20190758 (2021).
 - [31] S. A. Bentley, H. Laeverenz-Schlogelhofer, V. Anagnostidis, J. Cammann, M. G. Mazza, F. Gielen, and K. Y. Wan, *Elife* **11**, e76519 (2022).
 - [32] T. Brunet and D. Arendt, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150043 (2016).
 - [33] K. R. Rosholm, M. A. Baker, P. Ridone, Y. Nakayama, P. R. Rohde, L. G. Cuello, L. K. Lee, and B. Martinac, *Scientific reports* **7**, 1 (2017).
 - [34] K. Iwatsuki and Y. Naitoh, *Experientia* **38**, 1453 (1982).
 - [35] B. Gallois and R. Candelier, *PLOS Computational Biology* **17**, 1 (2021).

Bibliographie

- [1] R. S. JOHANSSON & A. B. VALLBO; “Tactile sensibility in the human hand : relative and absolute densities of four types of mechanoreceptive units in glabrous skin.” *The Journal of Physiology* **286**, pp. 283–300 (1979). ISSN 00223751. <https://online.library.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1979.sp012619>. 1
- [2] B. MARTINAC & C. KUNG; “The force-from-lipid principle and its origin, a ‘ *what is true for E. coli is true for the elephant*’ refrain”; *Journal of Neurogenetics* **36**, pp. 44–54 (2022). ISSN 0167-7063, 1563-5260. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01677063.2022.2097674>. 1, 4
- [3] A. ANISHKIN, S. H. LOUKIN, J. TENG & C. KUNG; “Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, pp. 7898–7905 (2014). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1313364111>. 1, 2, 4
- [4] B. COSTE, J. MATHUR, M. SCHMIDT, T. J. EARLEY, S. RANADE, M. J. PETRUS, A. E. DUBIN & A. PATAPOUTIAN; “Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels”; *Science* **330**, pp. 55–60 (2010). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1193270>. 2, 3, 5, 84, 88, 129
- [5] Y.-C. LIN, Y. R. GUO, A. MIYAGI, J. LEVRING, R. MACKINNON & S. SCHEURING; “Force-induced conformational changes in PIEZO1”; *Nature* **573**, pp. 230–234 (2019). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1499-2>. 2
- [6] J. SCHEIBERT, S. LEURENT, A. PREVOST & G. DEBRÉGEAS; “The Role of Fingerprints in the Coding of Tactile Information Probed with a Biomimetic Sensor”; *Science* **323**, pp. 1503–1506 (2009). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1166467>. 3, 4
- [7] J. WU, A. H. LEWIS & J. GRANDL; “Touch, Tension, and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels”; *Trends in Biochemical Sciences*

- 42**, pp. 57–71 (2017). ISSN 09680004. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000416301505>. 3, 5
- [8] B. MARTINAC & H. MACHEMER; “Effects of Varied Culturing and Experimental Temperature on Electrical Membrane Properties in *Paramecium*”; Journal of Experimental Biology **108**, pp. 179–194 (1984). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/108/1/179/4305/Effects-of-Varied-Culturing-and-Experimental>. 3, 35
- [9] H. S. JENNINGS; *Behavior of the lower organisms*. (Columbia University Press, New York) (1906). <http://content.apa.org/books/10817-000>. 5, 6, 7, 14, 20, 77
- [10] Y. NAITOH; “The control of ciliary activity in protozoa.” Cilia and flagella. pp. 305–352 (1974) Publisher : Academic Press. 6
- [11] Y. NAITOH & R. ECKERT; “Ionic Mechanisms Controlling Behavioral Responses of *Paramecium* to Mechanical Stimulation”; Science **164**, pp. 963–965 (1969). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.164.3882.963>. 7
- [12] J. E. DE PEYER & H. MACHEMER; “Hyperpolarizing and depolarizing mechanoreceptor potentials in *Stylonychia*”; Journal of comparative physiology **127**, pp. 255–266 (1978). ISSN 0340-7594, 1432-1351. <http://link.springer.com/10.1007/BF01350116>. 6, 7, 8
- [13] A. OGURA & H. MACHEMER; “Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane”; Journal of Comparative Physiology ? A **135**, pp. 233–242 (1980). ISSN 0340-7594, 1432-1351. <http://link.springer.com/10.1007/BF00657251>. 6, 7, 84, 88, 90, 94
- [14] H. MACHEMER & J. W. DEITMER; “Mechanoreception in Ciliates”; in “Progress in Sensory Physiology,” , volume 5, edited by H. AUTRUM, D. OTTOSON, E. R. PERL, R. F. SCHMIDT, H. SHIMAZU, W. D. WILLIS, H. AUTRUM, D. OTTOSON, E. R. PERL, R. F. SCHMIDT, H. SHIMAZU & W. D. WILLIS; pp. 81–118 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg) (1985); ISBN 978-3-642-70410-9 978-3-642-70408-6. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-70408-6_2; series Title : Progress in Sensory Physiology. 6, 16, 77, 88, 129
- [15] J. W. DEITMER; “Mechanosensory Transduction in Ciliates (Protozoa)”; in “Comparative Aspects of Mechanoreceptor Systems,” , volume 10, edited by R. GILLES & F. ITO; pp. 39–54 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg) (1992); ISBN 978-3-642-76692-3 978-3-642-76690-9. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-76690-9_3; series Title : Advances in Comparative and Environmental Physiology. 6, 77

- [16] Y. NAITOH; “Mechanosensory Transduction in Protozoa”; in “Membranes and Sensory Transduction,” , edited by G. COLOMBETTI & F. LENCI; pp. 113–135 (Springer US, Boston, MA) (1984); ISBN 978-1-4612-9665-2 978-1-4613-2675-5. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-2675-5_3. 6, 77
- [17] T. M. HENNESSEY, W. B. RUCKER & C. G. MCDIARMID; “Classical conditioning in paramecia”; *Animal Learning & Behavior* **7**, pp. 417–423 (1979). ISSN 0090-4996, 1532-5830. <http://link.springer.com/10.3758/BF03209695>. 6
- [18] Y. NAITOH & R. ECKERT; “Electrophysiology of the ciliate protozoa”; in “Experiments in physiology and biochemistry,” , volume 5pp. 17–38 (Academic Press, New York) (1972). 6
- [19] M. S. VALENTINE, J. YANO & J. VAN HOUTEN; “A Novel Role for Polycystin-2 (Pkd2) in *P. tetraurelia* as a Probable Mg²⁺ Channel Necessary for Mg²⁺-Induced Behavior”; *Genes* **10**, p. 455 (2019). ISSN 2073-4425. <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/6/455>. 8
- [20] C. CAMPILLO, J. JERBER, C. FISCH, M. SIMOES-BETBEDER, P. DUPUIS-WILLIAMS, P. NASSOY & C. SYKES; “Mechanics of membrane–cytoskeleton attachment in *Paramecium*”; *New Journal of Physics* **14**, p. 125016 (2012). ISSN 1367-2630. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1367-2630/14/12/125016>. 8
- [21] S. JANA, A. EDDINS, C. SPOON & S. JUNG; “Somersault of *Paramecium* in extremely confined environments”; *Scientific Reports* **5**, p. 13148 (2015). ISSN 2045-2322. <http://www.nature.com/articles/srep13148>. 8, 28
- [22] M. JALAAL, N. SCHRAMMA, A. DODE, H. DE MALEPRADE, C. RAUFASTE & R. E. GOLDSTEIN; “Stress-Induced Dinoflagellate Bioluminescence at the Single Cell Level”; *Physical Review Letters* **125**, p. 028102 (2020). ISSN 0031-9007, 1079-7114. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.125.028102>. 8, 9
- [23] K. R. ROSHOLM, M. A. B. BAKER, P. RIDONE, Y. NAKAYAMA, P. R. ROHDE, L. G. CUELLO, L. K. LEE & B. MARTINAC; “Activation of the mechanosensitive ion channel MscL by mechanical stimulation of supported Droplet-Hydrogel bilayers”; *Scientific Reports* **7**, p. 45180 (2017). ISSN 2045-2322. <http://www.nature.com/articles/srep45180>. 9, 88
- [24] J.-M. AURY, O. JAILLON, L. DURET, B. NOEL, C. JUBIN, B. M. PORCEL, B. SÉGURENS, V. DAUBIN, V. ANTHOUARD, N. AIACH, O. ARNAIZ, A. BILLAUT, J. BEISSON, I. BLANC, K. BOUHOUCHE, F. CÂMARA, S. DUHARCOURT, R. GUIGO, D. GOGENDEAU, M. KATINKA, A.-M. KELLER, R. KISSMEHL, C. KLOTZ, F. KOLL, A. LE MOUËL, G. LEPÈRE, S. MALINSKY, M. NOWACKI, J. K. NOWAK, H. PLATTNER, J. POULAIN, F. RUIZ, V. SERRANO, M. ZAGULSKI, P. DESSEN, M. BÉTERMIER,

- J. WEISSENBACH, C. SCARPELLI, V. SCHÄCHTER, L. SPERLING, E. MEYER, J. COHEN & P. WINCKER; “Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*”; *Nature* **444**, pp. 171–178 (2006). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/nature05230>. 10, 128
- [25] T. ISHIKAWA & M. HOTA; “Interaction of two swimming *Paramecia*”; *Journal of Experimental Biology* **209**, pp. 4452–4463 (2006). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/209/22/4452/16308/Interaction-of-two-swimming-Paramecia>. 10, 11
- [26] B. AHMAD, H. MAEDA & T. KAWAHARA; “Dynamic Response of Swimming *Paramecium* Induced by Local Stimulation Using a Threadlike-Microtool”; *IEEE Robotics and Automation Letters* **5**, pp. 2570–2577 (2020). ISSN 2377-3766, 2377-3774. <https://ieeexplore.ieee.org/document/8988211/>. 10, 11
- [27] E. E. POWELSON, M. A. GATES & J. BERGER; “A biometrical analysis of 22 stocks of four syngens of *Paramecium aurelia*”; *Canadian Journal of Zoology* **53**, pp. 19–32 (1975). ISSN 0008-4301, 1480-3283. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/z75-003>. 10
- [28] K. HAUSMANN & R. D. ALLEN; “Electron Microscopy of *Paramecium* (Ciliata)”; in “*Methods in Cell Biology*,” , volume 96pp. 143–173 (Elsevier) (2010); ISBN 978-0-12-381007-6. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X1096007X>. 12
- [29] T. OMORI, H. ITO & T. ISHIKAWA; “Swimming microorganisms acquire optimal efficiency with multiple cilia”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, pp. 30201–30207 (2020). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2011146117>. 12, 13
- [30] H. MACHEMER; “Ciliary activity and the origin of metachrony in *Paramecium* : effects of increased viscosity”; *Journal of Experimental Biology* **57**, pp. 239–259 (1972)Publisher : Citeseer. 12
- [31] A.-M. TASSIN, M. LEMULLOIS & A. AUBUSSON-FLEURY; “*Paramecium tetraurelia* basal body structure”; *Cilia* **5**, p. 6 (2015). ISSN 2046-2530. <http://www.ciliajournal.com/content/5/1/6>. 10
- [32] F. IFTODE, J. COHEN, F. RUIZ, A. RUEDA, L. CHEN-SHAN, A. ADOUTTE & J. BEISSON; “Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type”; *Development* **105**, pp. 191–211 (1989). ISSN 1477-9129, 0950-1991. <https://journals.biologists.com/dev/article/105/2/191/36409/Development-of-surface-pattern-during-division-in>. 10

- [33] R. ECKERT & Y. NAITOH; “Passive Electrical Properties of Paramecium and Problems of Ciliary Coordination”; *Journal of General Physiology* **55**, pp. 467–483 (1970). ISSN 1540-7748, 0022-1295. <https://rupress.org/jgp/article/55/4/467/31424/Passive-Electrical-Properties-of-Paramecium-and>. 11
- [34] W. GILPIN, M. S. BULL & M. PRAKASH; “The multiscale physics of cilia and flagella”; *Nature Reviews Physics* **2**, pp. 74–88 (2020). ISSN 2522-5820. <https://www.nature.com/articles/s42254-019-0129-0>. 11
- [35] B. PÁRDU CZ; “Ciliary Movement and Coordination in Ciliates”; in “*International Review of Cytology*,” , volume 21pp. 91–128 (Elsevier) (1967); ISBN 978-0-12-364321-6. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608608128>. 13
- [36] R. WICHTERMAN; *The Biology of Paramecium*; second edition edition (Springer US, Boston, MA) (1986); ISBN 978-1-4757-0372-6; oCLC : 840290077. 13
- [37] A. HAMEL, C. FISCH, L. COMBETTES, P. DUPUIS-WILLIAMS & C. N. BAROUD; “Transitions between three swimming gaits in *Paramecium* escape”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, pp. 7290–7295 (2011). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1016687108>. 13
- [38] H. S. JENNINGS; “Studies on reactions to stimuli in unicellular organisms : I. reactions to chemical, osmotic and mechanical stimuli in the ciliate infusoria”; *The Journal of physiology* **21**, p. 258 (1897)Publisher : Wiley-Blackwell. 13
- [39] A. M. ROBERTS; “The mechanics of gravitaxis in *Paramecium*”; *Journal of Experimental Biology* **213**, pp. 4158–4162 (2010). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/213/24/4158/9993/The-mechanics-of-gravitaxis-in-Paramecium>. 13, 20
- [40] P. JENSEN; *Ueber den geotropismus niederer organismen* (Medizinische Facultät zu Jena) (1892). 13
- [41] H. S. JENNINGS; “The method of regulation in behavior and in other fields”; *Journal of Experimental Zoology* **2**, pp. 473–494 (1905)Publisher : Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company New York. 14
- [42] O. GLASER; “Temperature and the mechanism of locomotion in *Paramecium*”; *The Journal of General Physiology* **9**, pp. 115–121 (1925)Publisher : Rockefeller University Press. 14
- [43] K. TAWADA & H. MIYAMOTO; “Sensitivity of *Paramecium* thermotaxis to temperature change”; *The Journal of Protozoology* **20**, pp. 289–292 (1973)Publisher : Wiley Online Library. 14

- [44] H. TOYOTAMA & Y. NAKAOKA; “Effect of Temperature on the Swimming Velocity of Triton-Extracted Models of *Paramecium caudatum*”; *Cell Structure and Function* **4**, pp. 35–43 (1979). ISSN 0386-7196, 1347-3700. http://www.jstage.jst.go.jp/article/csf1975/4/1/4_1_35/_article. 14, 20
- [45] H. S. JENNINGS; “Studies on reactions to stimuli in unicellular organisms. ii.—the mechanism of the motor reactions of *Paramecium*”; *American Journal of Physiology-Legacy Content* **2**, pp. 311–341 (1899)Publisher : American Physiological Society. 14, 134
- [46] J. VAN HOUTEN; “Two mechanisms of chemotaxis in *Paramecium*”; *Journal of comparative physiology* **127**, pp. 167–174 (1978)Publisher : Springer. 14
- [47] H. DALE; “Galvanotaxis and chemotaxis of ciliate infusoria : Part I”; *The Journal of Physiology* **26**, p. 291 (1901)Publisher : Wiley-Blackwell. 14
- [48] K. LUDLOFF; “Untersuchungen über den Galvanotropismus”; *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **59**, pp. 525–554 (1895)Publisher : Springer. 14
- [49] K. IWATSUKI & Y. NAITOH; “Photoresponses in colorless *Paramecium*”; *Experientia* **38**, pp. 1453–1454 (1982). ISSN 1420-9071. <https://doi.org/10.1007/BF01955765>. 14, 23
- [50] T. MAJIMA; “Membrane potential fluctuation in *paramecium*”; *Biophysical Chemistry* **11**, pp. 101–108 (1980). ISSN 03014622. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0301462280850125>. 15
- [51] W. H. MOOLENAAR, J. DE GOEDE & A. A. VERVEEN; “Membrane noise in *Paramecium*”; *Nature* **260**, pp. 344–346 (1976). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/260344a0>. 15, 84
- [52] Y. NAKAOKA, T. IMAJI, M. HARA & N. HASHIMOTO; “Spontaneous fluctuation of the resting membrane potential in *Paramecium* : amplification caused by intracellular Ca²⁺”; *Journal of Experimental Biology* **212**, pp. 270–276 (2009). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/212/2/270/18477/Spontaneous-fluctuation-of-the-resting-membrane>. 15, 84
- [53] R. ECKERT & P. BREHM; “Ionic Mechanisms of Excitation in *Paramecium*”; *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **8**, pp. 353–383 (1979). ISSN 0084-6589. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bb.08.060179.002033>. 15, 16, 21
- [54] R. ECKERT; “Bioelectric Control of Ciliary Activity : Locomotion in the ciliated protozoa is regulated by membrane-limited calcium fluxes.” *Science* **176**, pp. 473–

- 481 (1972). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.176.4034.473>. 15
- [55] R. BRETTE; “Integrative Neuroscience of *Paramecium* , a “Swimming Neuron””; *eneuro* **8**, pp. ENEURO.0018–21.2021 (2021). ISSN 2373-2822. <https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0018-21.2021>. 15, 87, 94
- [56] I. ELICES, A. KULKARNI, N. ESCOUBET, L.-L. PONTANI, A. M. PREVOST & R. BRETTE; “An electrophysiological and kinematic model of *Paramecium* , the “swimming neuron””; preprint; *Neuroscience* (2022). <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.02.15.480485>. 15, 40, 54, 84, 108, 136, 137, 138
- [57] A. L. HODGKIN & A. F. HUXLEY; “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”; *The Journal of Physiology* **117**, pp. 500–544 (1952). ISSN 0022-3751, 1469-7793. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>. 15
- [58] A. KULKARNI, I. ELICES, N. ESCOUBET, L.-L. PONTANI, A. M. PREVOST & R. BRETTE; “A simple device to immobilize protists for electrophysiology and microinjection”; *Journal of Experimental Biology* **223**, p. jeb219253 (2020). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/223/12/jeb219253/224563/A-simple-device-to-immobilize-protists-for>. 17, 54
- [59] “*Paramecium* culture medium”; *Cold Spring Harbor Protocols* **2010**, p. pdb.rec12080 (2010). ISSN 1940-3402, 1559-6095, 1559-6095. <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.rec12080>. 20
- [60] R. L. CONNER & W. J. VAN WAGTENDONK; “Steroid Requirements of *Paramecium aurelia*”; *Journal of General Microbiology* **12**, pp. 31–36 (1955). ISSN 0022-1287. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-12-1-31>. 20
- [61] K. HASEGAWA & A. TANAKADATE; “Circadian rhythm of locomotor behavior in a population of *Paramecium multimicronucleatum* : its characteristics as derived from circadian changes in the swimming speeds and the frequencies of avoiding response among individual cells”; *Photochemistry and Photobiology* **40**, pp. 105–112 (1984). ISSN 0031-8655, 1751-1097. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1984.tb04560.x>. 20
- [62] K. HASEGAWA, T. KATAKURA & A. TANAKADATE; “Circadian rhythm in the locomotor behavior in a population of *paramecium multimicronucleatum* ”; *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* **15**, pp. 45–56 (1984). ISSN 0022-1945. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09291018409359833>. 20

- [63] R. HINRICHSSEN, D. BELSKY, L. JONES & R. MIALKI; “The frequency of the spontaneous behavioral response in *Paramecium tetraurelia* is simultaneously modulated by both ultradian and circadian rhythms”; *Biological Rhythm Research* **44**, pp. 377–390 (2013). ISSN 0929-1016, 1744-4179. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09291016.2012.692254>. 20
- [64] F. KIPPERT; “An ultradian clock controls locomotor behaviour and cell division in isolated cells of *Paramecium tetraurelia*”; *Journal of Cell Science* **109**, pp. 867–873 (1996). ISSN 1477-9137, 0021-9533. <https://journals.biologists.com/jcs/article/109/4/867/24796/An-ultradian-clock-controls-locomotor-behaviour>. 20
- [65] R. D. HINRICHSSEN; “The frequency of the behavioral response in *Paramecium tetraurelia* displays an ultradian rhythm : a regulatory role for the inositol signaling pathway”; *Biological Rhythm Research* **41**, pp. 457–475 (2010). ISSN 0929-1016, 1744-4179. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09291010903411500>. 20
- [66] W. H. MITCHELL; “The division rate of *Paramecium* in relation to temperature”; *Journal of Experimental Zoology* **54**, pp. 383–410 (1929). ISSN 0022-104X, 1097-010X. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jez.1400540303>. 20
- [67] P. BREHM, K. DUNLAP & R. ECKERT; “Calcium-dependent repolarization in *Paramecium*”; *The Journal of Physiology* **274**, pp. 639–654 (1978). ISSN 00223751. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1978.sp012171>. 21
- [68] G. W. ZACK, W. E. ROGERS & S. A. LATT; “Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **25**, pp. 741–753 (1977). ISSN 0022-1554, 1551-5044. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/25.7.70454>. 24
- [69] B. PANNETON; “Gray image thresholding using the Triangle Method”; (2022). <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/28047-gray-image-thresholding-using-the-triangle-method>. 24
- [70] B. GALLOIS & R. CANDELIER; “FastTrack : An open-source software for tracking varying numbers of deformable objects”; *PLOS Computational Biology* **17**, pp. 1–19 (2021). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008697>; publisher : Public Library of Science. 25

- [71] F. CHAUMETTE; “Image Moments : A General and Useful Set of Features for Visual Servoing”; IEEE Transactions on Robotics **20**, pp. 713–723 (2004). ISSN 1546-1904. <http://ieeexplore.ieee.org/document/1321161/>. 26
- [72] L. ROCHA, L. VELHO & P. CARVALHO; “Image moments-based structuring and tracking of objects”; in “Proceedings. XV Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing,” pp. 99–105 (IEEE Comput. Soc, Fortaleza-CE, Brazil) (2002); ISBN 978-0-7695-1846-6. <http://ieeexplore.ieee.org/document/1167130/>. 26
- [73] L. LEMELLE, J.-F. PALIERNE, E. CHATRE & C. PLACE; “Counterclockwise Circular Motion of Bacteria Swimming at the Air-Liquid Interface”; Journal of Bacteriology **192**, pp. 6307–6308 (2010). ISSN 0021-9193, 1098-5530. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00397-10>. 28
- [74] W. R. DiLUZIO, L. TURNER, M. MAYER, P. GARSTECKI, D. B. WEIBEL, H. C. BERG & G. M. WHITESIDES; “Escherichia coli swim on the right-hand side”; Nature **435**, pp. 1271–1274 (2005). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/nature03660>. 28
- [75] H. S. JENNINGS; “The behavior of Paramecium. Additional features and general relations”; Journal of Comparative Neurology and Psychology **14**, pp. 441–510 (1904) Publisher : Denison University Ohio. 28
- [76] Z. AZZOUZ, H. BERREBBAH & M. R. DJEBAR; “Optimization of Paramecium tetraurelia growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole”; African Journal of Microbiology Research **5**, pp. 3242–3250 (2011). ISSN 1996-0808. <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/31DA99413604>. 32
- [77] T. OKA & Y. NAKAOKA; “Inactivation and activation of inward current during adaptation to potassium ions in Paramecium caudatum.” Cell Structure and Function **14**, pp. 209–216 (1989). ISSN 0386-7196, 1347-3700. http://www.jstage.jst.go.jp/article/csf1975/14/2/14_2_209/_article. 35
- [78] T. OKA, Y. NAKAOKA & F. OOSAWA; “Changes in Membrane Potential during Adaptation to External Potassium Ions in *Paramecium Caudatum*”; Journal of Experimental Biology **126**, pp. 111–117 (1986). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/126/1/111/5220/Changes-in-Membrane-Potential-during-Adaptation-to>. 35, 39
- [79] Y. NAKAOKA, H. TOKUI, Y. GION, S. INOUE & F. OOSAWA; “Behavioral Adaptation of Paramecium caudatum to Environmental Temperature : The Effect of Cell

- Density”; Proceedings of the Japan Academy, Series B **58**, pp. 213–217 (1982). ISSN 0386-2208, 1349-2896. http://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab1977/58/7/58_7_213/_article. 35
- [80] Y. NAKAOKA & F. OOSAWA; “Temperature-Sensitive Behavior of *Paramecium caudatum*”; The Journal of Protozoology **24**, pp. 575–580 (1977). ISSN 00223921. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1977.tb01018.x>. 35
- [81] “Dryl’s buffer”; Cold Spring Harbor Protocols **2010**, p. pdb.rec12072 (2010). ISSN 1940-3402, 1559-6095, 1559-6095. <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.rec12072>. 36
- [82] M. DEFORET, J. DUPLAT, N. VANDENBERGHE & E. VILLERMAUX; “On random search : Collection kinetics of *Paramecia* into a trap embedded in a closed domain”; American Journal of Physics **78**, pp. 574–579 (2010). ISSN 0002-9505, 1943-2909. <http://aapt.scitation.org/doi/10.1119/1.3293976>. 36
- [83] H. C. BERG; “Bacterial behaviour”; Nature **254**, pp. 389–392 (1975). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/254389a0>. 51
- [84] H. C. BERG; *Random walks in biology*; expanded ed edition (Princeton University Press, Princeton, N.J) (1993); ISBN 978-0-691-00064-0. 51
- [85] H. C. BERG & D. A. BROWN; “Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking”; nature **239**, pp. 500–504 (1972)Publisher : Springer. 52
- [86] E. A. CODLING, M. J. PLANK & S. BENHAMOU; “Random walk models in biology”; Journal of The Royal Society Interface **5**, pp. 813–834 (2008). ISSN 1742-5689, 1742-5662. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2008.0014>. 52
- [87] J. KLAFTER & I. M. SOKOLOV; *First Steps in Random Walks : From Tools to Applications* (Oxford University Press) (2011); ISBN 978-0-19-923486-8. <https://academic.oup.com/book/5408>. 52
- [88] S. CHANDRASEKHAR; “Stochastic Problems in Physics and Astronomy”; Reviews of Modern Physics **15**, pp. 1–89 (1943). ISSN 0034-6861. <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.15.1>. 52
- [89] N. OTSU; “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms”; IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics **9**, pp. 62–66 (1979). ISSN 0018-9472, 2168-2909. <http://ieeexplore.ieee.org/document/4310076/>. 59

- [90] J. ILLINGWORTH & J. KITTLER ; “The Adaptive Hough Transform” ; IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence **PAMI-9**, pp. 690–698 (1987). ISSN 0162-8828. <https://ieeexplore.ieee.org/document/4767964>. 59
- [91] T. ATHERTON & D. KERBYSON ; “Size invariant circle detection” ; Image and Vision Computing **17**, pp. 795–803 (1999). ISSN 02628856. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0262885698001607>. 59
- [92] V. KANTSLER, J. DUNKEL, M. POLIN & R. E. GOLDSTEIN ; “Ciliary contact interactions dominate surface scattering of swimming eukaryotes” ; Proceedings of the National Academy of Sciences **110**, pp. 1187–1192 (2013). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1210548110>. 60, 66
- [93] M. CONTINO, E. LUSHI, I. TUVAL, V. KANTSLER & M. POLIN ; “Microalgae Scatter off Solid Surfaces by Hydrodynamic and Contact Forces” ; Physical Review Letters **115**, p. 258102 (2015). ISSN 0031-9007, 1079-7114. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.115.258102>. 60, 65, 66, 68, 87
- [94] A. THÉRY, Y. WANG, M. DVORIASHYNA, C. ELOY, F. ELIAS & E. LAUGA ; “Rebound and scattering of motile *Chlamydomonas* algae in confined chambers” ; Soft Matter **17**, pp. 4857–4873 (2021). ISSN 1744-683X, 1744-6848. <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0SM02207A>. 69, 70
- [95] Q. ROVEILLO, J. DERVAUX, Y. WANG, F. ROUYER, D. ZANCHI, L. SEURONT & F. ELIAS ; “Trapping of swimming microalgae in foam” ; Journal of The Royal Society Interface **17**, p. 20200077 (2020). ISSN 1742-5689, 1742-5662. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2020.0077>. 70
- [96] Y. SATOW, A. DON MURPHY & C. KUNG ; “The Ionic Basis of the Depolarizing Mechanoreceptor Potential of *Paramecium Tetraurelia*” ; Journal of Experimental Biology **103**, pp. 253–264 (1983). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/103/1/253/4041/The-Ionic-Basis-of-the-Depolarizing>. 84, 88
- [97] H. MACHEMER ; “Modification of ciliary activity by the rate of membrane potential changes in *Paramecium*” ; Journal of Comparative Physiology ? A **101**, pp. 343–356 (1975). ISSN 0340-7594, 1432-1351. <http://link.springer.com/10.1007/BF00657050>. 84, 90
- [98] S. LODH, J. YANO, M. S. VALENTINE & J. L. VAN HOUTEN ; “Voltage-gated calcium channels of *Paramecium* cilia” ; Journal of Experimental Biology **219**, pp. 3028–3038 (2016). ISSN 1477-9145, 0022-0949. <https://journals.biologists.com/jeb/article/219/19/3028/15594/Voltage-gated-calcium-channels-of-Paramecium-cilia>. 86, 131, 149

- [99] A. OGURA & K. TAKAHASHI; “Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent responses in *Paramecium*”; *Nature* **264**, pp. 170–172 (1976). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/264170a0>. 86
- [100] T. BRUNET & D. ARENDT; “From damage response to action potentials : early evolution of neural and contractile modules in stem eukaryotes”; *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, p. 20150043 (2016). ISSN 0962-8436, 1471-2970. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2015.0043>. 87
- [101] Y. NAKAOKA & K. IWATSUKI; “Hyperpolarization-activated inward current associated with the frequency increase in ciliary beating of *Paramecium*”; *Journal of Comparative Physiology A* **170** (1992). ISSN 0340-7594, 1432-1351. <http://link.springer.com/10.1007/BF00198983>. 90
- [102] T. BHATTACHARJEE & S. S. DATTA; “Bacterial hopping and trapping in porous media”; *Nature Communications* **10**, p. 2075 (2019). ISSN 2041-1723. <http://www.nature.com/articles/s41467-019-10115-1>. 91
- [103] L. G. SCHNITZLER, A. PAEGER, M. S. BRUGGER, M. F. SCHNEIDER & C. WESTERHAUSEN; “Reversible single cell trapping of *Paramecium caudatum* to correlate swimming behavior and membrane state”; *Biomicrofluidics* **16**, p. 024102 (2022). ISSN 1932-1058. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/5.0084084>. 91, 110
- [104] O. SIPOS, K. NAGY, R. DI LEONARDO & P. GALAJDA; “Hydrodynamic Trapping of Swimming Bacteria by Convex Walls”; *Physical Review Letters* **114**, p. 258104 (2015). ISSN 0031-9007, 1079-7114. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.114.258104>. 91
- [105] Y. TAKAHA & D. NISHIGUCHI; “Quasi-two-dimensional bacterial swimming around pillars : enhanced trapping efficiency and curvature dependence”; (2022). <https://arxiv.org/abs/2203.16017>; publisher : arXiv Version Number : 1. 91
- [106] P. B. APPLEWHITE; “Learning in protozoa”; *Biochemistry and physiology of protozoa* **1**, pp. 341–355 (1979) Publisher : Academic Press New York. 94
- [107] I. KUNITA, T. YAMAGUCHI, A. TERO, M. AKIYAMA, S. KURODA & T. NAKAGAKI; “A ciliate memorizes the geometry of a swimming arena”; *Journal of The Royal Society Interface* **13**, p. 20160155 (2016). ISSN 1742-5689, 1742-5662. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2016.0155>. 94
- [108] I. KUNITA, S. KURODA, K. OHKI & T. NAKAGAKI; “Attempts to retreat from a dead-ended long capillary by backward swimming in *Paramecium*”; *Frontiers in Microbiology* **5** (2014). ISSN 1664-302X. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00270/abstract>. 94

- [109] A. DUSSUTOUR; “Learning in single cell organisms”; *Biochemical and Biophysical Research Communications* **564**, pp. 92–102 (2021). ISSN 0006291X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X21001959>. 95
- [110] R. F. THOMPSON & W. A. SPENCER; “Habituation : A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior.” *Psychological Review* **73**, pp. 16–43 (1966). ISSN 1939-1471, 0033-295X. <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/h0022681>. 95
- [111] J. E. SEGALL, S. M. BLOCK & H. C. BERG; “Temporal comparisons in bacterial chemotaxis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, pp. 8987–8991 (1986). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.83.23.8987>. 95, 96
- [112] S. M. BLOCK, J. E. SEGALL & H. C. BERG; “Impulse responses in bacterial chemotaxis”; *Cell* **31**, pp. 215–226 (1982). ISSN 00928674. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867482904214>. 95, 96
- [113] P.-G. DE GENNES; “Chemotaxis : the role of internal delays”; *European Biophysics Journal* **33**, pp. 691–693 (2004). ISSN 0175-7571, 1432-1017. <http://link.springer.com/10.1007/s00249-004-0426-z>. 96
- [114] A. CELANI & M. VERGASSOLA; “Bacterial strategies for chemotaxis response”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, pp. 1391–1396 (2010). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0909673107>. 96
- [115] E. EISENSTEIN, D. BRUNDER & H. BLAIR; “Habituation and sensitization in an aeneural cell : Some comparative and theoretical considerations”; *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **6**, pp. 183–194 (1982). ISSN 01497634. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0149763482900549>. 99
- [116] C. BECHINGER, R. DI LEONARDO, H. LÖWEN, C. REICHHARDT, G. VOLPE & G. VOLPE; “Active Particles in Complex and Crowded Environments”; *Reviews of Modern Physics* **88**, p. 045006 (2016). ISSN 0034-6861, 1539-0756. <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.88.045006>. 103
- [117] M. BRUN-COSME-BRUNY, E. BERTIN, B. COASNE, P. PEYLA & S. RAFAÏ; “Effective diffusivity of microswimmers in a crowded environment”; *The Journal of Chemical Physics* **150**, p. 104901 (2019). ISSN 0021-9606, 1089-7690. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5081507>. 103, 118
- [118] E. M. PURCELL; “Life at low Reynolds number”; *American Journal of Physics* **45**, pp. 3–11 (1977). ISSN 0002-9505, 1943-2909. <http://aapt.scitation.org/doi/10.1119/1.10903>. 104

- [119] J. R. HOWSE, R. A. L. JONES, A. J. RYAN, T. GOUGH, R. VAFABAKHSH & R. GOLESTANIAN; “Self-Motile Colloidal Particles : From Directed Propulsion to Random Walk”; *Physical Review Letters* **99**, p. 048102 (2007). ISSN 0031-9007, 1079-7114. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.99.048102>. 104
- [120] B. J. BERNE & P. PECHUKAS; “Gaussian Model Potentials for Molecular Interactions”; *The Journal of Chemical Physics* **56**, pp. 4213–4216 (1972). ISSN 0021-9606, 1089-7690. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1677837>. 106
- [121] C. F. SCHRECK, M. MAILMAN, B. CHAKRABORTY & C. S. O’HERN; “Constraints and vibrations in static packings of ellipsoidal particles”; *Physical Review E* **85**, p. 061305 (2012). ISSN 1539-3755, 1550-2376. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.85.061305>. 106, 107
- [122] D. J. CLEAVER, C. M. CARE, M. P. ALLEN & M. P. NEAL; “Extension and generalization of the Gay-Berne potential”; *Physical Review E* **54**, pp. 559–567 (1996). ISSN 1063-651X, 1095-3787. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.54.559>. 106
- [123] S. DATTA & D. K. SRIVASTAVA; “Stokes drag on axially symmetric bodies : a new approach”; *Proceedings - Mathematical Sciences* **109**, pp. 441–452 (1999). ISSN 0253-4142, 0973-7685. <http://link.springer.com/10.1007/BF02838005>. 111
- [124] A. FIRE, S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER & C. C. MELLO; “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*”; *Nature* **391**, pp. 806–811 (1998). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/35888>. 127
- [125] L. TIMMONS & A. FIRE; “Specific interference by ingested dsRNA”; *Nature* **395**, pp. 854–854 (1998). ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/articles/27579>. 127
- [126] A. GALVANI & L. SPERLING; “RNA interference by feeding in *Paramecium*”; *Trends in Genetics* **18**, pp. 11–12 (2002). ISSN 01689525. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952501025483>. 127
- [127] L. DURET, J. COHEN, C. JUBIN, P. DESSEN, J.-F. GOÛT, S. MOUSSET, J.-M. AURY, O. JAILLON, B. NOËL, O. ARNAIZ, M. BÉTERMIER, P. WINCKER, E. MEYER & L. SPERLING; “Analysis of sequence variability in the macronuclear DNA of *Paramecium tetraurelia* : A somatic view of the germline”; *Genome Research* **18**, pp. 585–596 (2008). ISSN 1088-9051. <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.074534.107>. 128
- [128] J. BEISSON, M. BÉTERMIER, M.-H. BRÉ, J. COHEN, S. DUHARCOURT, L. DURET, C. KUNG, S. MALINSKY, E. MEYER, J. R. PREER & L. SPERLING; “Silencing

- Specific *Paramecium tetraurelia* Genes by Feeding Double-Stranded RNA”; Cold Spring Harbor Protocols **2010**, p. pdb.prot5363 (2010). ISSN 1940-3402, 1559-6095, 1559-6095. <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot5363>. 128
- [129] L. VOLKERS, Y. MECHIOUKHI & B. COSTE; “Piezo channels : from structure to function”; Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **467**, pp. 95–99 (2015). ISSN 0031-6768, 1432-2013. <http://link.springer.com/10.1007/s00424-014-1578-z>. 129
- [130] X.-Z. FANG, T. ZHOU, J.-Q. XU, Y.-X. WANG, M.-M. SUN, Y.-J. HE, S.-W. PAN, W. XIONG, Z.-K. PENG, X.-H. GAO & Y. SHANG; “Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels”; Cell & Bioscience **11**, p. 13 (2021). ISSN 2045-3701. <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-020-00522-z>. 129
- [131] O. ARNAIZ, S. CAIN, J. COHEN & L. SPERLING; “ParameciumDB : a community resource that integrates the Paramecium tetraurelia genome sequence with genetic data”; Nucleic Acids Research **35**, pp. D439–D444 (2007). ISSN 0305-1048, 1362-4962. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gk1777>. 129
- [132] O. ARNAIZ, E. MEYER & L. SPERLING; “ParameciumDB 2019 : integrating genomic data across the genus for functional and evolutionary biology”; Nucleic Acids Research **48**, pp. D599–D605 (2020). ISSN 1362-4962. 129
- [133] S. F. ALTSCHUL, W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS & D. J. LIPMAN; “Basic local alignment search tool”; Journal of Molecular Biology **215**, pp. 403–410 (1990). ISSN 00222836. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602>. 129
- [134] H. PLATTNER; “The contractile vacuole complex of protists – New cues to function and biogenesis”; Critical Reviews in Microbiology **41**, pp. 218–227 (2015). ISSN 1040-841X, 1549-7828. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.821650>. 131
- [135] L. LAPATSINA, J. BRAND, K. POOLE, O. DAUMKE & G. R. LEWIN; “Stomatin-domain proteins”; European Journal of Cell Biology **91**, pp. 240–245 (2012). ISSN 01719335. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933511000392>. 131
- [136] A. T. REUTER, C. A. O. STUERMER & H. PLATTNER; “Identification, Localization, and Functional Implications of the Microdomain-Forming Stomatin Family in

- the Ciliated Protozoan *Paramecium tetraurelia*”; *Eukaryotic Cell* **12**, pp. 529–544 (2013). ISSN 1535-9778, 1535-9786. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00324-12>. 131, 132
- [137] K. DRESCHER, K. C. LEPTOS & R. E. GOLDSTEIN; “How to track protists in three dimensions”; *Review of Scientific Instruments* **80**, p. 014301 (2009). ISSN 0034-6748, 1089-7623. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3053242>. 134, 138
- [138] T. DARNIGE, N. FIGUEROA-MORALES, P. BOHEC, A. LINDNER & E. CLÉMENT; “Lagrangian 3D tracking of fluorescent microscopic objects in motion”; *Review of Scientific Instruments* **88**, p. 055106 (2017). ISSN 0034-6748, 1089-7623. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4982820>. 137
- [139] A. OGURA; “Deciliation and Reciliation in *Paramecium* after Treatment with Ethanol”; *Cell Structure and Function* **6**, pp. 43–50 (1981). ISSN 0386-7196, 1347-3700. http://www.jstage.jst.go.jp/article/csf1975/6/1/6_1_43/_article. 138