



**HAL**  
open science

# Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique numérique

Simon Becker, Lucie Klopffer, Laurence Mathieu, Michel Gross, N. Louvet

## ► To cite this version:

Simon Becker, Lucie Klopffer, Laurence Mathieu, Michel Gross, N. Louvet. Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique numérique. Congrès Francophone de Techniques Laser, Sep 2024, Lyon, France. hal-04768058

**HAL Id: hal-04768058**

**<https://hal.science/hal-04768058v1>**

Submitted on 5 Nov 2024

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique numérique

Simon BECKER<sup>1</sup>, Lucie Klopffer<sup>1,2</sup>, Laurence Mathieu<sup>2,3</sup>, Michel GROSS<sup>4</sup>, Nicolas LOUVET<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, LEMTA, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup>Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France

<sup>3</sup>EPHE, PSL, UMR CNRS 7564, LCPME, F-54000 Nancy, France

<sup>4</sup>Laboratoire Charles Coulomb (L2C), Université de Montpellier, CNRS, Montpellier, France

\*(auteur correspondant : nicolas.louvet@univ-lorraine.fr)

**Résumé** - Nous présentons dans cette étude une expérience de microscopie holographique numérique en ligne pour le suivi de bactéries en milieu confiné. Cette technique, simple de mise en oeuvre, nous permet de caractériser la dynamique d'une suspension bactérienne dans un capillaire d'une centaine de micromètres. Nous présentons également le logiciel holotracker en libre accès qui permet de propager des hologrammes par la méthode du spectre angulaire et également d'utiliser différentes fonction de focus puis de tracking.

## Nomenclature

$p_x, p_y$  Taille des pixels caméra

$\lambda$  Longueur d'onde laser

$E_R, E_O$  Champs des ondes de référence et objet

$H_0$  Hologramme dans le plan capteur

$H$  Hologramme propagé

$u_x, u_y$  Fréquences spatiale en  $x$  et  $y$

## 1. Introduction

La formation de biofilms est un processus complexe et multifactoriels qui a fait et continue de faire l'objet de nombreuses études [1]. En particulier, l'effet de l'hydrodynamique sur le développement de biofilm mature a connu un regain d'intérêt lié à l'essor de la microfluidique et des nouvelles techniques expérimentales telles que la microscopie confocale, la microscopie à force atomique ou encore l'utilisation de l'intelligence artificielle [2]. Plus récemment, des travaux ont mis en évidence que les étapes d'adhésion initiales des bactéries pionnières impactaient grandement le développement du biofilm et par conséquent sa résistance à diverses contraintes d'origines chimiques, biologiques ou mécaniques [3]. Cependant, la caractérisation de ces événements pionniers est relativement compliquée de part la rareté des événements et également par la nécessité de suivre en 3D et dans le temps les bactéries colonisatrices.

Les techniques classiques d'épi-fluorescence ou de contraste de phase ne permettent qu'une visualisation des bactéries dans le plan focal de l'objectif limitant le temps d'observation à quelques fractions de secondes voir seconde. Plus récemment, l'utilisation de suivi individuel par une technique de refocalisation continue a permis de reconstruire des trajectoires spatialement et temporellement mais de façon individuelle [4]. La microscopie holographique permet quand à elle d'accéder, par un principe de reconstruction numérique du champ électromagnétique, à une information 4D d'une collection de bactéries en suspension dans un écoulement

Nous présentons dans cette étude la mise en place d'une telle configuration de microscopie holographique numérique en ligne sur le suivi de bactéries en milieu confiné ainsi qu'un logiciel

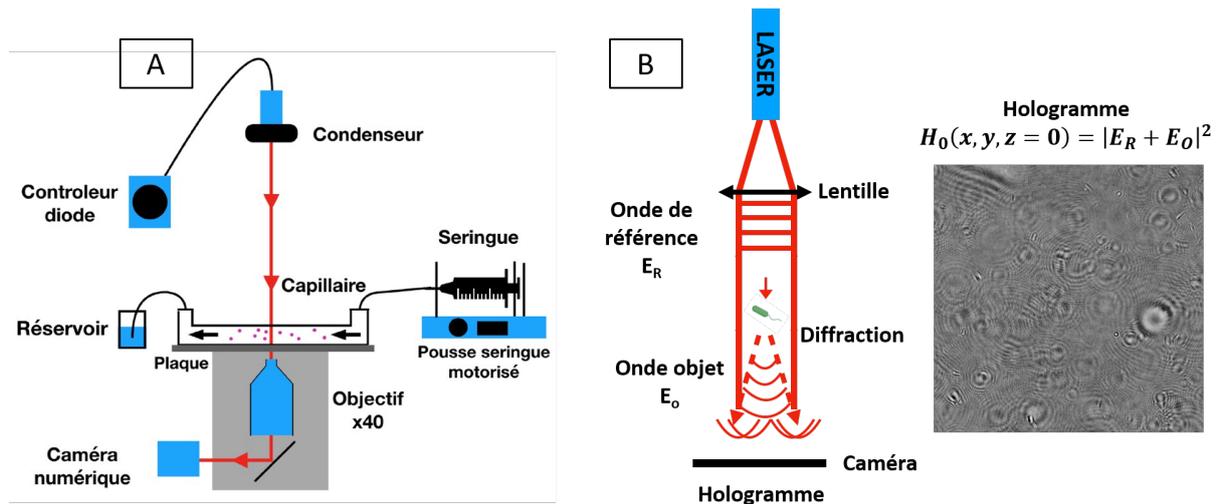


Figure 1 : A) Dispositif expérimental. B) Formation d'un hologramme dans la configuration de Gabor.

en libre accès qui encapsule les étapes de reconstruction d'hologramme, de détection et de reconstruction des trajectoires.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Culture bactérienne

La bactérie d'étude est une souche modèle *Schewanella oneidensis* MR-1. A partir d'un culot bactérien conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  la bactérie est remise en culture sur des plaques constituées d'agar et de milieu de culture Lysogeny. Après 2 jours d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ , plusieurs colonies de *S. oneidensis* sont prélevées pour inoculer 50 ml de milieu LB dilué 10 fois. La suspension bactérienne est alors laissée en culture toute la nuit ( $30^{\circ}\text{C}$ , 160 rpm) puis centrifugée (4 minutes à 4500 rpm) et enfin resuspendue dans un milieu frais LB/10. La suspension bactérienne est ensuite remise en culture jusqu'à atteindre une concentration finale de  $5.10^7$  bactéries / ml. ( $D.0 = 0.03$ ).

### 2.2. Dispositif de microscopie holographique

Le dispositif microfluidique consiste en un capillaire de verre (Vitrocom) de section à fort rapport d'aspect (largeur 1 mm et hauteur 0.1 mm) et d'une longueur de 10 cm. Le dispositif est disposé sur un microscope inversé équipé d'un objectif (40X,  $NA = 0.90$ ) et d'une caméra CMOS (1024x1024 pixels,  $px = py = 7 \mu\text{m}$ ) dont la fréquence d'acquisition est adaptée en fonction des conditions d'écoulement (Figure 1A). Le dispositif holographique « en ligne » est constitué d'une diode laser fibrée monomode ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ , 50 mW, Thorlabs LP660-SF50) munie d'un collimateur fibré (Thorlabs PAF2P-A10A) pour éclairer la suspension de bactéries au sein du capillaire et former ainsi les hologrammes sur le capteur CMOS. L'utilisation d'une diode laser fibrée (fibre optique monomode SM600) ayant un diamètre compris entre  $3.6 \mu\text{m}$  et  $5.3 \mu\text{m}$ , nous assure une facilité d'utilisation en évitant l'utilisation d'un épurateur de faisceau.

## 2.3. Algorithme d'analyse des hologrammes

### 2.3.1. Formation des hologrammes

Dans la mesure où la suspension de bactéries est très diluée (environ 50 bactéries dans le volume de mesure), nous pouvons travailler dans une configuration de Gabor qui est simple à mettre en oeuvre. Ce type de montage, dit in-line, ne nécessite pas de séparer le faisceau laser en 2 bras (objet et référence), mais d'éclairer simplement le capillaire par une onde plane (laser colimaté). Dû fait de la faible modification du champ électromagnétique par les bactéries en suspension, nous pouvons considérer que le champ en aval du dispositif résulte de la superposition de l'onde de référence ( $E_R$ ) et de l'onde objet ( $E_O$ ) issue de la diffraction par les bactéries. Les interférences issues de ces deux ondes sont finalement enregistrées sur le plan capteur pour donner un hologramme  $H_0(x, y)$  des intensités du champ d'illumination et du champ objet tel que :

$$H_0(x, y) = H_0(x, y, z = 0) = |E_R + E_O|^2 = E_R^2 + E_O^2 + E_R E_O^* + E_R^* E_O \quad (1)$$

où  $E_R^2 + E_O^2$  correspond à l'ordre 0 de diffraction,  $E_R E_O^*$  à l'ordre -1 et  $E_R^* E_O$  à l'ordre +1. Ces deux derniers termes, complexe conjugué l'un de l'autre, contiennent l'information sur la position des bactéries dans le capillaire. Dans la configuration in-line, ces deux termes ne sont pas séparables ce qui entraîne une indétermination sur la position des bactéries dans les plans  $z > 0$  ou  $z < 0$ . Pour remédier à ce problème, le plan de focalisation est positionné sur une paroi du capillaire. L'intensité du signal de l'ordre indésirable contribue alors faiblement par un signal défocalisé.

### 2.3.2. Retropropagation des hologrammes

Pour des faibles distances de propagation, la méthode du spectre angulaire est adaptée [5]. Cette méthode repose sur la décomposition en ondes planes du champ diffracté et permet de calculer l'hologramme propagé à un plan  $z$  à partir de l'hologramme au plan capteur par la relation suivante :

$$H(x, y, z) = TF^{-1} \left[ e^{-\frac{2i\pi z}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda u_x)^2 - (\lambda u_y)^2}} TF [H_0(x, y)] \right] \quad (2)$$

où les opérateurs  $TF$  et  $TF^{-1}$  correspondent respectivement à la transformée de Fourier et son inverse,  $\lambda$  la longueur d'onde du laser,  $u_x$  et  $u_y$  les fréquences spatiales associées aux coordonnées  $x$  et  $y$ . Le noyau de propagation n'est valable qu'à la condition  $u_x^2 + u_y^2 < 1/\lambda^2$  et vaut 0 sinon.

## 2.4. traitement des hologrammes

Le traitement des hologrammes se fait selon le logigramme présenté en Figure 2. Les hologrammes sont tout d'abord nettoyés par une soustraction de l'hologramme moyen (environ 6000 hologrammes pour un film) puis propagés par pas de  $0,5 \mu\text{m}$  sur 200 plans afin d'obtenir un volume complexe 3D d'une profondeur de  $100 \mu\text{m}$ . Durant la phase de propagation nous appliquons un filtrage circulaire de la composante continue ainsi que des hautes fréquences dans le plan de Fourier ce qui permet d'améliorer significativement la localisation des bactéries. Une fois le volume complexe reconstruit, il est nécessaire de faire ressortir les contrastes du signal. Une difficulté dans la détection des bactéries provient du fait que leur indice optique est proche de celui de l'eau conduisant à un très faible contraste naturel. Pour augmenter ce contraste nous avons tester différentes fonctions de focus (somme de l'intensité, du gradient, du carré du Laplacien, TENENGRAD) [ref]. Un exemple de traitement d'une bactérie dans différents plans de

coupe est présentée en Figure 3. Le volume d'intensité obtenu, contenant les objets focalisés, est ensuite binarisé. Finalement, les voxels d'intérêt sont regroupés et labellés par la méthode de CCL3D (Connected Component Labelling) afin de déterminer leur barycentre. Nous obtenons une liste des différentes bactéries associées à leur coordonnées au cours du temps. A cette étape, le lien n'est pas encore effectué pour reconstruire les trajectoires et il est nécessaire de relier les différentes bactéries en leurs associant un numéro tout au long de la séquence.

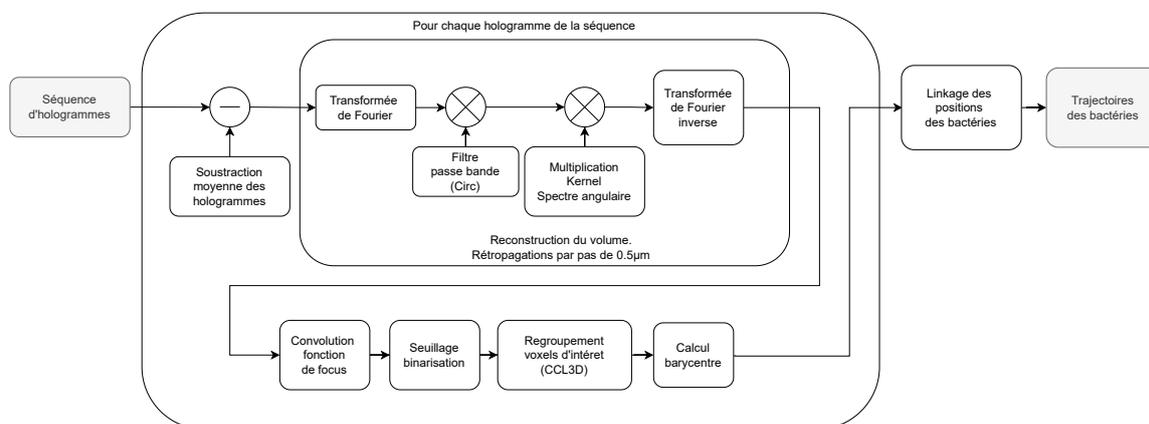


Figure 2 : Logigramme de traitement des hologrammes.

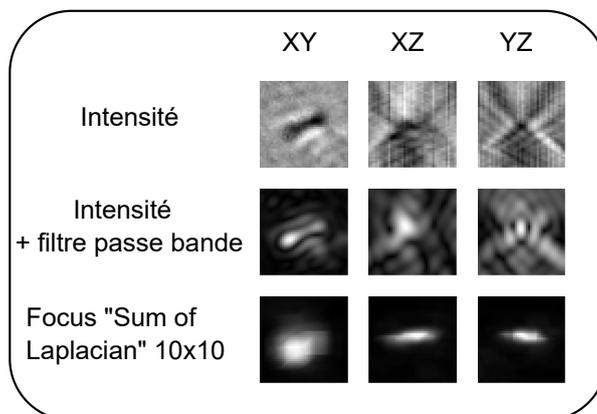


Figure 3 : Séquence de traitement d'une bactérie

## 2.5. HoloTracker

Afin d'effectuer les traitements présentés plus haut, nous avons développé deux logiciels : HoloTrackerLocate et HoloTrackerLink. Le premier permet de localiser les bactéries sur une séquence d'hologrammes. Le second permet d'attribuer un identifiant aux bactéries localisées afin de déterminer leurs trajectoires. Ces deux logiciels sont librement téléchargeables à l'adresse suivante [6].

HoloTrackerLocate est constitué d'une interface homme-machine développée sous Labview appelant un code Python (Figure 4). Initialement développé en Labview/C++/Cuda nous avons décidé de redevelopper le traitement en Python pour une facilité de partage et de développement. HoloTracker utilise la puissance de calcul et la parallélisation des cartes graphiques NVIDIA par

l'utilisation des bibliothèques Python Cupy. CuPy est un wrapper Python-CUDA permettant d'utiliser de façon quasi-transparente les fonctions des bibliothèques de calcul Numpy et Scipy et de profiter de la parallélisation offerte par les GPU. Plusieurs wrappers ont été testés : Numba, PyCuda et CuPy. Nous avons retenu ce dernier pour sa simplicité d'utilisation et ses performances. Cupy permet également d'importer du code CUDA et permet de convertir une fonction Python en Kernel CUDA par l'utilisation d'un compilateur à la volée (JIT). Sur un PC portable standard (Core i5, 16Go de Ram, GPU Quadro GTX 3000) la localisation des bactéries sur un hologramme prends environ 2.5 secondes avec HoloTrackerLocate. Ce traitement comprends 1 FFT 1024x1024, 200 FFT inverses, le calcul du focus sur un volume de 1024x1024x200 float32, la binarisation de ce volume ainsi que le CCL3D (seule fonction tournant sur CPU).

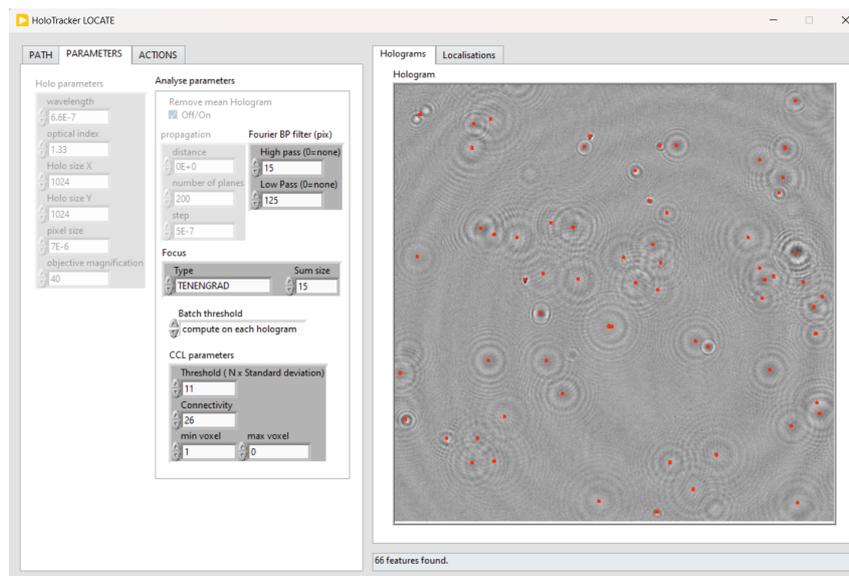


Figure 4 : Interface HoloTrackerLocate permettant le traitement des hologrammes.

HoloTrackerLink est une interface développée sous Labview appelant principalement les fonctions de la bibliothèque trackpy.

### 3. Résultats

Nos premières expériences ont été réalisées sans écoulement imposé à la suspension. Dans cette condition nous déterminons les caractéristiques de la souche de bactérie utilisée : fraction de bactéries motiles ("nageuses"), dynamique de "run and tumble", vitesse et temps de résidence à une paroi. Des résultats de trajectoires sont présentés sur les Figures 5 A et B. Une première constatation est la présence de bactéries motiles (présence et activité de flagelle permettant la motilité des bactéries). Cette fraction de bactéries représente environ 20 % de la population parmi des bactéries soumises uniquement au mouvement Brownien.

L'analyse individuelle des trajectoires des bactéries motiles nous permet d'accéder à la vitesse de nage. Un exemple d'analyse est présenté sur la Figure 6 où est tracé la vitesse de nage en fonction du temps pour une trajectoire particulière. La vitesse, dont la moyenne vaut approximativement  $40 \mu\text{m/s}$ , montre des variations importantes au cours du temps. Ces variations sont corrélées au changement de direction de la bactérie (tumble) comme illustré sur la figure 6. Contrairement aux travaux de la littérature, la méthode d'holographie mise en place dans cette étude nous permet de donner des informations 3D sur une population plus conséquente et

d'envisager de caractériser des interactions entre bactéries grâce au suivi multiple.

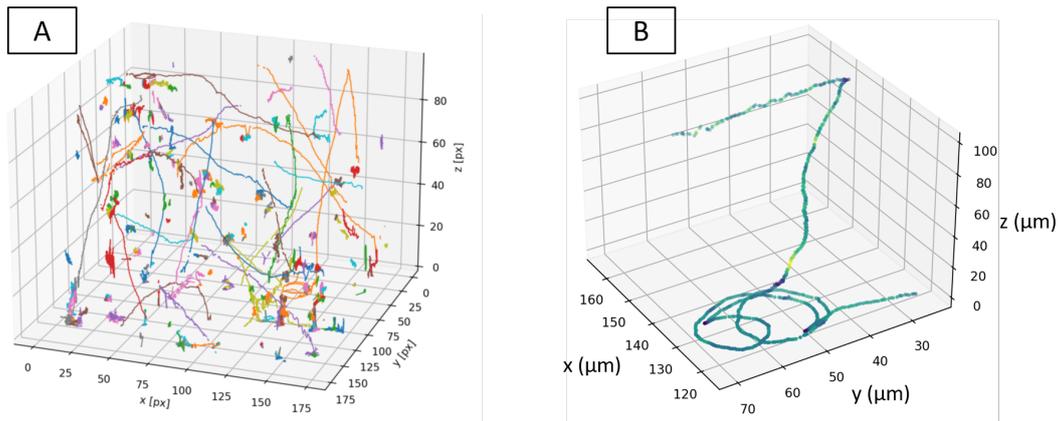


Figure 5 : A) Trajectoires des bactéries. B) Trajectoire isolée d'une bactérie

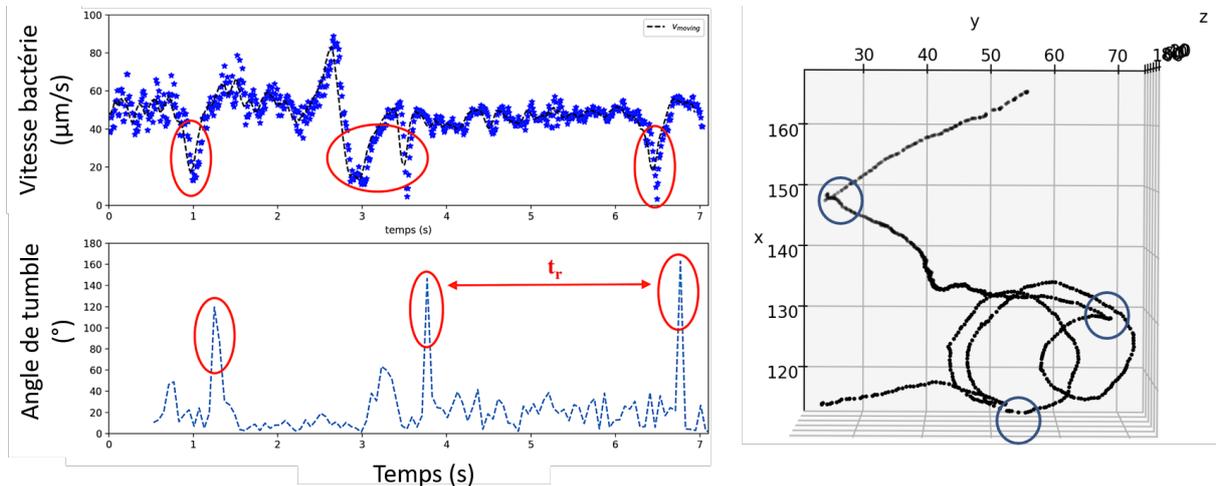


Figure 6 : Analyses des trajectoires de bactérie motile : vitesse, angle, tumble

## 4. Conclusion

Dans cette étude nous avons mis au point un dispositif de microscopie holographique de type Gabor afin de suivre des bactéries en suspension dans un écoulement confiné. Nos premiers résultats nous ont permis de caractériser le comportement de la bactérie dans un environnement statique : portion de bactéries motiles / non-motiles, vitesse, fréquence de tumble. L'étude sera prochainement étendue à la configuration sous écoulement afin de caractériser la dynamique d'attachement et détachement des bactéries aux parois.

## Références

- [1] A. Penesyan, I.T. Paulsen, S. Kjelleberg, M.R. Gillings, Three faces of biofilms : a microbial life-style, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *Npj Biofilms Microbiomes* 7 (2021)
- [2] A. Karimi, D. Karig, A. Kumar, A.M. Ardekani, Interplay of physical mechanisms and biofilm processes : review of microfluidic methods, *Lab. Chip* 15 23-42 (2015)

- [3] S. Lecuyer, R. Rusconi, Y. Shen, A. Forsyth, H. Vlamakis, R. Kolter et H.A Stone, Shear Stress increase the Residence Time of Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100, 341 – 350 (2011)
- [4] T. Darnige, N. Figueroa-Morales, P. Bohec, A. Lindner, E. Clément, Lagrangian 3D tracking of fluorescent microscopic objects in motion. *Rev. Sci. Instrum.*, 88 (5) : 055106 (2017)
- [5] P. Picart, *New techniques in digital holography*, ISTE Ltd and John Wiley Sons Inc (2015)
- [6] <https://github.com/S1m0nB3ck3r/HoloTracker>

**Remerciements** : Les auteurs remercient l'ANR BIOCIDES (ANR-21-CE50-0027), ainsi que le pôle scientifique EMPP de l'université de Lorraine pour le financement de cette étude.