

La vie à haute température : Etude des micro-organismes thermophiles par microscopie à front d'onde sous chauffage plasmonique

Au fond des océans, près des fumeurs noirs, un phénomène remarquable se produit. Malgré les températures extrêmes dépassant plus de 100°C, certains micro-organismes, appelés thermophiles, parviennent à survivre et à se développer dans cet environnement hostile. Comprendre comment la vie se maintient dans des conditions aussi extrêmes est du plus grand intérêt pour élargir notre compréhension de la façon dont la nature fait face aux températures élevées. De plus, ces connaissances pourraient permettre le développement d'applications biologiques à haute température.

Cependant, l'étude des micro-organismes thermophiles *in vitro* pose de grands défis. Pour les observer vivre, il faudrait chauffer une platine de microscope à des températures de 100°C ou plus, ce qui est difficile à réaliser. Par conséquent, la plupart des observations sont aujourd'hui effectuées sur des échantillons morts à l'aide de la microscopie électronique. Cette limitation peut être frustrante pour les biologistes qui cherchent à explorer la complexité de ces organismes lorsqu'ils sont vivants et actifs.

Dans ce projet, une technique de microscopie haute température assistée par laser est utilisée pour permettre l'activation et l'étude d'organismes thermophiles sous un microscope conventionnel. La méthode consiste à cultiver des thermophiles sur une lamelle de verre recouverte de nanoparticules d'or. Ces nanoparticules d'or possèdent des propriétés optiques uniques qui leur permettent d'absorber et de convertir l'énergie lumineuse en chaleur. Lorsqu'elles sont éclairées par un laser à leur longueur d'onde de résonance plasmonique, ces nanoparticules génèrent une chaleur intense dans leur environnement immédiat. Cela crée une augmentation localisée de la température qui active les thermophiles à très petite échelle. Lorsque les bactéries prennent vie sous le microscope, nous pouvons alors suivre leur métabolisme à l'aide d'une technique de microscopie de front d'onde. La microscopie de front d'onde est une technique d'imagerie de phase quantitative qui permet d'observer les micro-organismes avec un contraste élevé sans utiliser aucun marquage. Cela signifie que nous pouvons visualiser directement la morphologie, le comportement et les interactions des micro-organismes sans introduire de perturbations externes dans le système. Cette approche d'imagerie non invasive préserve l'état naturel des micro-organismes et permet une compréhension plus précise de leur comportement et de leur dynamique dans des conditions de température extrêmes. L'une des capacités remarquables de cette approche quantitative est la mesure de la masse sèche des micro-organismes. En analysant les images de différence de chemin optique obtenues par cette technique, nous pouvons obtenir des mesures quantitatives de la masse sèche des micro-organismes. Cette capacité ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la croissance et du développement des micro-organismes sur une longue période de temps sans altérer leur métabolisme. L'autre capacité remarquable de la microscopie à front d'onde est la possibilité de détecter les variations de l'indice de réfraction induites par la chaleur. Lorsque la température change dans l'échantillon, l'indice de réfraction du milieu environnant change aussi. En mesurant précisément ces variations, nous pouvons cartographier le champ de température créé par le chauffage laser des nanoparticules d'or à l'échelle microscopique. La carte de température et la mesure de la masse sèche des micro-organismes à l'aide de la microscopie de front d'onde nous permettent d'étudier de multiples comportements biologiques tels que la croissance, les mécanismes de défense, la motilité ou la formation de biofilms.

Life at high temperature: Investigating thermophilic micro-organisms using wavefront microscopy under plasmonic heating

At the bottom of the ocean, close to black smokers, a remarkable phenomenon occurs. Despite the extreme temperatures exceeding 100°C, some microorganisms, known as thermophiles, manage to thrive and survive in this harsh environment. The ability to understand how life sustains itself under such extreme conditions is of utmost interest to expand our fundamental understanding of how nature copes with high temperatures. Furthermore, this knowledge has significant implications for the development of biological applications in high-temperature settings.

However, studying thermophilic microorganisms in vitro poses great challenges. It would require the heating of a microscope stage to high temperatures of 100°C or higher, which is technically complex and difficult to achieve. As a result, most observations of thermophilic microorganisms today are conducted on dead samples using electron microscopy. This limitation can be frustrating for biologists who seek to explore the complexity of these organisms while they are alive and active.

In this project, a laser-assisted high-temperature technique called plasmonic heating is used to enable the successful activation and study of thermophilic organisms under a conventional microscope, without the need for complex settings. The method involves the culture of thermophilic bacteria on a glass coverslip covered with gold nanoparticles. These gold nanoparticles possess unique optical properties that allow them to absorb and convert light energy into localized heat. When illuminated with laser light at their plasmonic resonance wavelength, these nanoparticles generate intense heat in their immediate surrounding, under the microscope's field of view. This effect creates a localized temperature increase that activates thermophilic bacteria on very small scales.

As bacteria come to life under the microscope, we can then follow their metabolism using an optical imaging technique called wavefront microscopy. Wavefront microscopy is a quantitative phase imaging technique that allows the observation of microorganisms with high contrast without the use of fluorescent dyes or any other labeling techniques. This means that we can directly visualize the microorganisms' morphology, behavior, and interactions without introducing any external perturbations to the system. This non-invasive imaging approach preserves the natural state of the microorganisms and enables a more accurate understanding of their behavior and dynamics under extreme temperature conditions.

One of the remarkable capabilities of this quantitative approach is the measurement of the dry mass of microorganisms. By analyzing the optical path difference images obtained from this microscopy technique, we can derive quantitative measurements of the microorganisms' dry mass. This capability opens up new avenues for studying the growth and development of microorganisms over long periods of time without altering the microorganism metabolism. The other remarkable capability of wavefront microscopy is the ability to detect thermal-induced variations of the refractive index. As the temperature changes in the sample, the refractive index of the surrounding medium and the microorganisms themselves undergo alterations. By precisely measuring these variations, we can map the temperature field at the micro-scale level created by the laser heating of gold nanoparticles. Both the temperature map and the microorganism dry mass measurement using wavefront microscopy allowed me to study multiple biological behaviors such as growth, defense mechanism, motility or biofilm formation.