

Année 2017

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : « Ingénierie pour le vivant »

préparée au **Laboratoire Ampère**

dans le cadre de l'Ecole Doctorale « **Electronique, Electrotechnique et Automatique** »

par

David Royet

**Nouvelle approche de décryptage de la diversité bactérienne environnementale
par capture magnétique de populations spécifiques de bactéries au sein de
microbiotes complexes**

JURY

Rapporteur	Pierre Peyret	Professeur – Université d’Auvergne
Rapporteur	Florence Ploetze	Maître de conférences –Université de Strasbourg
Examineur	Michael S. Dubow	Professeur Université Paris-Sud
Examineur	Florence Razan	Maître de conférences - ENS Rennes
Examineur	Jean-Pierre Cloarec	Professeur – Ecole Centrale de Lyon
Examineur	Timothy M. Vogel	Professeur – Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de thèse	Pascal Simonet	Directeur de recherche CNRS, Ecole Centrale de Lyon
Encadrant	Marie Frénéa-Robin	Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1

Remerciements

J'aimerais tout d'abord commencer par remercier mes deux encadrants Pascal Simonet et Marie Frénéa-Robin ! Merci de m'avoir donné l'opportunité de venir pour ces trois ans (et quelques mois...) au laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet. Pascal, merci d'avoir partagé avec moi ton amour sans limite pour la science et l'Auvergne. Je sais que tu es désormais un fervent défenseur de cette région ! Marie, merci pour ta grande implication dans mes travaux et pour ta gentillesse.

Je remercie également les différents membres de mon jury : Pierre Peyret, Florence Ploetze, Michael S. Dubow, Florence Razan et Jean-Pierre Cloarec. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et pour les échanges que nous avons eus le jour de la soutenance, ces derniers furent très enrichissants.

Un grand merci à Jérémy Pivetal qui s'est toujours rendu disponible pour me donner un coup de main et discuter de l'avancée de ma thèse.

Tim, arigatō gozaimasu ! Merci pour ton soutien, ton intérêt pour mes travaux, et toutes les discussions hors-science que nous avons pu avoir.

Merci aux membres de l'Institut Néel : Nora M Dempsey et Thibaut Devillers pour leur aide dans le cadre de ce projet. Merci à Pierre Cremillieu et Radoslaw Mazurczyk de l'INL pour leur disponibilité et le support qu'ils ont pu m'apporter.

Un grand merci à Laure Franqueville, Sandrine Demaneche et Sébastien Cécillon qui ont toujours été prêt à m'apporter leur aide. Le laboratoire tourne bien en grande partie grâce à vous ! Je remercie également Richard qui malgré mon « œil lubrique » a toujours été disponible pour me dépanner!

Un grand merci aussi aux copains : Christoph, Agathe « the power ! », Alexiane (le binôme des manips' tard le soir), Arthur et Axel la ficelle (qui n'oublieront pas de se laver les mains...) avec qui j'ai vraiment passé de super moments ! Un grand merci aussi à Anjali, Julien Marchalot, Julien Pézard, Kevin, Jérémy R., Samia, Joseph, Lorrie (à qui je peux aussi enfin dire : ari no

mama no !), Laura, JS, Cat, Cécile, Thibault, Graeme et Christina. Je remercie aussi mes loulous de Clermont, Mike, Jo, Tom et Ben. Je n'oublie pas aussi les jeunes arrivants : Mia, Adrien (qui un jour, ira plus loin que la diapo n°3), Romie et Benoit. J'ai passé avec vous tous de très bons moments au laboratoire mais aussi (et surtout !) en dehors ☺. Merci pour tout ☺ !

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir pendant ces trois ans : Edith, Marie-Christine, Isabelle, Arnaud, Eric, Naoufel, Alice, Jacques, Riccardo, Gérard,... J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.

Merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents et ma blonde, vous êtes les piliers fondateurs de ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre confiance et votre soutien. Love u !

Mes derniers remerciements vont à Maryline qui a tout fait pour m'aider, qui m'a soutenu et surtout supporté pendant ces 3 années.

Sommaire

Liste des figures.....VIII

Liste des abréviationsXIII

Introduction Générale : Les bactéries environnementales..... 1

I. L'approche culturale..... 4

II. Les approches indépendantes de la culture *in vitro* 5

Chapitre 1 : Le tri cellulaire appliqué à l'étude des bactéries environnementales 10

I. Introduction 10

II. Biodiversité bactérienne dans un sol..... 12

A. Structure et composition des sols..... 12

1) La fraction minérale 13

2) La fraction organique 14

3) Structure d'un sol 14

4) L'eau et le gaz 15

B. Extraction des bactéries à partir d'un échantillon de sol..... 15

III. Le marquage des bactéries 17

A. Introduction et généralités sur le tri cellulaire..... 17

B. L'immunomarquage..... 18

C. Le marquage des acides nucléiques : l'hybridation *in situ* 21

D. Production de molécules fluorescentes 23

E. Ciblage de bactéries actives à l'aide de nanoparticules magnétiques..... 24

IV. Les différentes stratégies d'hybridation *in situ* :..... 26

A. Structure générale des sondes 26

B. Les cibles des sondes 28

C. Hybridation *in situ* et fluorescence : le FISH..... 31

D. Hybridation *in situ* et magnétisme : le MISH 35

V. Généralités sur le magnétisme 37

A. Les matériaux magnétiques..... 37

B. Les particules magnétiques 41

C. Les forces d'attraction magnétique 42

VI. Les outils de tri cellulaire..... 43

A.	Les trieurs de cellules macroscopiques basés sur la fluorescence	44
1)	La cytométrie en flux ou FACS®.....	44
2)	Avantages et Inconvénients.....	46
B.	Les trieurs de cellules macroscopiques basés sur le magnétisme	47
1)	Les aimants permanents	47
2)	Le « Magnetic Activated Cell Sorter » ou MACS®.....	47
3)	Avantages et Inconvénients.....	48
C.	Introduction à la microfluidique	49
D.	Les micro-trieurs fluorescents.....	50
E.	Les micro-trieurs magnétiques	52
1)	Les sources externes : les aimants permanents conventionnels.....	53
2)	Sources intégrées.....	54
•	Les micro-électro-aimants	54
•	Les micro-structures en matériaux doux	56
•	Les micro-aimants permanents.....	57
F.	Précédents travaux réalisés au laboratoire Ampère	59
VII.	Conclusions.....	61
Chapitre 2 : Mise au point de méthodes de marquage des bactéries par hybridation <i>in situ</i> magnétique ...		64
I.	Introduction	64
II.	Matériels et Méthodes.....	70
A.	Préparation des échantillons.....	70
1)	Souches utilisées.....	70
•	Culture <i>in vitro</i> et extraction d'ADN.....	70
•	Fixation des cellules	71
•	Contrôle du marquage et de l'absence d'adsorption aspécifique	71
B.	Technique « MISH » : marquage de bactéries par sondes polyribonucléotidiques	72
1)	Synthèse des sondes biotinylées	72
2)	Marquage par hybridation <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	73
3)	Marquage par hybridation <i>in situ</i> magnétique (MISH)	73
C.	Hybridation en chaîne ou HCR.....	74
1)	Sondes utilisées	74
2)	Stratégie des expériences préliminaires.....	74
3)	Marquage fluorescent	75

4) Marquage magnétique	76
D. Tri de bactéries dans un microsystème magnétique.....	77
1) Fabrication du microsystème :.....	77
2) Tri cellulaire :	78
E. PCR quantitative.....	78
III. Résultats et discussion	79
A. Hybridation <i>in situ</i> magnétique avec une sonde courte	79
B. Marquage avec des sondes polyribonucléotidiques (MISH)	79
1) Détermination des conditions optimales d'hybridation assurant un marquage spécifique.....	82
2) Hybridation <i>in situ</i> magnétique	87
3) Expériences de capture sur microsystème	92
• Sonde <i>Pseudomonas putida</i>	93
• Sonde <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	94
• Sonde <i>Escherichia coli</i>	94
C. Hybridation en chaîne ou HCR.....	97
1) Expériences initiales.....	97
2) Mise au point d'un marquage spécifique par HCR (marquage fluorescent)	101
3) Confirmation de la spécificité du marquage HCR (marquage magnétique).....	103
D. Comparaison MISH/HCR.....	105
1) Structure du marquage et applications potentielles	105
2) Sensibilité du marquage	106
IV. Conclusions.....	107

Chapitre 3 : Capture de populations bactériennes spécifiques dans des suspensions bactériennes extraites d'échantillons environnementaux de type sol par MISH et HCR

I. Introduction	109
II. Matériels et Méthodes.....	109
A. Extraction des bactéries	109
B. Marquage des cellules par hybridation <i>in situ</i>	111
1) MISH.....	111
2) HCR.....	112
C. Tri en système microfluidique	113
D. Analyse de la biodiversité des fractions récoltées.....	113
III. Résultats et Discussion.....	114

A.	MISH.....	116
B.	HCR	125
IV.	Conclusions et Perspectives	129
Chapitre 4 : Développement d'un nouveau procédé de fabrication de dispositifs microfluidiques pour le tri magnétique		132
I.	Introduction	132
II.	Structures microfluidiques adaptées au tri sous flux continu.....	134
A.	Etat de l'art.....	134
B.	Structure du microsystème développé	138
C.	Identification des forces en jeu	139
III.	Fabrication du dispositif en PDMS composite magnétique.....	140
A.	Le Polydiméthylsiloxane, un matériau de choix pour la microfluidique	140
B.	Les matériaux polymères composites magnétiques	143
1)	Avantage des polymères composites.....	143
2)	Choix des matrices et dopant employés	143
C.	Structuration et intégration de PDMS magnétique	145
1)	Approche "Doctor-Blade".....	145
2)	Micro-moulage de PDMS composite par injection	148
3)	Approche proposée.....	150
IV.	Caractérisation du PDMS magnétique.....	158
V.	Simulations numériques du champ magnétique généré	160
VI.	Test en présence de particules.....	161
A.	Tests d'attraction en « statique ».....	161
B.	Tests de déflexion magnétique.....	165
C.	Développements et optimisations en cours	167
VII.	Conclusions.....	171
Conclusions Générales		173
Références		176

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu des différentes approches existantes pour l'étude de la biodiversité microbienne.	3
Figure 2 : Proportion volumique des différents groupes dans lesquels sont classés les composants d'un sol.	13
Figure 3 : Structure générale d'un anticorps.	19
Figure 4 : Principe de l'immunomarquage direct et indirect.	20
Figure 5 : Principe général de l'hybridation in situ appliquée à des bactéries ; exemple de sondes fluorescentes complémentaires de régions du gène 16S.	23
Figure 6 : Représentation schématique du processus de récupération de bactéries vivantes et actives par fonctionnalisation de surface avec des nanoparticules magnétiques et mise en culture.	25
Figure 7 : Structure des LNA par rapport aux ADN et ARN.	28
Figure 8 : Représentation schématique du marquage fluorescent direct et indirect.	32
Figure 9 : Représentation schématique du marquage FISH et CARD-FISH.	33
Figure 10 : Schéma du fonctionnement des techniques RCA-FISH [165] et HCR [179] pour la formation d'une structure d'acides nucléiques pour l'amplification du signal après hybridation.	34
Figure 11 : Principe du marquage avec des sondes polyribonucléotidiques selon l'hypothèse de la formation d'un réseau de sondes extracellulaires.	36
Figure 12 : Comportement de différents matériaux magnétiques sous l'effet d'un champ magnétique et courbes d'aimantation de ces matériaux.	39
Figure 13 : Courbe de première aimantation et Cycle d'hystérésis pour des matériaux ferromagnétiques décrivant le comportement d'un matériau ferromagnétique sous l'effet d'un champ d'excitation H.	40
Figure 14 : Structure générale d'une particule magnétique composée d'un cœur magnétique recouvert d'une couche de polymère permettant la fonctionnalisation de la particule. d'après [189].	41
Figure 15 : Illustration de l'effet de la miniaturisation de la source de champ.	43
Figure 16 : Principe général du fonctionnement d'un FACS permettant le tri de cellules par déflection électrostatique.	45
Figure 17 : Principe de fonctionnement du MACS®.	48
Figure 18 : Différents types d'écoulements fluidiques.	50
Figure 19 : Représentation schématique du premier μ FACS proposé en 1999 par Fu <i>et al.</i> [200].	51
Figure 20 : Photographie d'un microsystème intégrant un aimant permanent pour la capture de cellules cancéreuses.	53
Figure 21 : Exemples de réalisations de micro-électro-aimants d'après Ramadan et al. 2009.	55
Figure 22 : Exemples d'aimants doux microstructurés intégrés dans des microsystèmes [206,211].	56
Figure 23 : Description du procédé TMP (Thermo Magnetic Patterning) permettant la micro-structuration de films magnétiques.	58
Figure 24 : Observation de billes magnétiques (A) ou de bactéries magnétiques (B) fluorescentes sur un réseau de micro-aimants de 100 x 100 μ m (barre d'échelle = 100 μ m).	58
Figure 25 : Contrôle de l'épaisseur du film de PDMS déposé sur les micro-aimants.	60

Figure 26: Photographie du microsystème intégrant un réseau de micro-aimants de 100 x 100 μm	60
Figure 27 : Principe du marquage avec des sondes polyribonucléotidiques selon l'hypothèse de la formation d'un réseau de sondes extracellulaires.	67
Figure 28 : Schéma du fonctionnement du marquage d'acides nucléiques par la technique de HCR.....	68
Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'assemblage entre les deux sondes amplificatrices en fonction de la concentration en sondes initiatrices.	69
Tableau 1 : Référence des trois souches utilisées pour les travaux préliminaires de mise au point du marquage.	70
Tableau 2 : Sondes sélectionnées pour les marquages de type HCR.	74
Tableau 3: Plan d'expérimentation préliminaire pour vérifier le bon fonctionnement de la HCR.	75
Figure 30 : Représentation schématique du dispositif [172,223].....	78
Figure 31 : Comparatif Immunomarquage magnétique (1) et hybridation in situ magnétique avec une sonde oligonucléotidique (Eub338) (2).	79
Figure 32 : Alignement de séquences multiples des domaines III, cible des sondes, des trois souches contrôle à l'aide de l'outil d'alignement multiple Clustal Omega.	80
Figure 33 : Structure secondaire prédite pour la sonde 23S ciblant <i>Pseudomonas putida</i> obtenue à l'aide de mfold.	81
Figure 34 : Contrôle de la taille des produits PCR concernant le domaine III du gène 23S (avec deux bandes pour chaque souche). Taille théorique ≈ 250 pb.	82
Figure 35 : Exemple d'observations réalisées par microscopie à épifluorescence (objectif x 50)	83
Tableau 4 : Résumé des résultats du marquage fluorescent de la sonde <i>Pseudomonas putida</i> sur les deux autres souches contrôles.	85
Tableau 5 : Résumé des résultats obtenus par hybridation in situ fluorescente avec les sondes polyribonucléotidiques.	85
Figure 36 : Observation de la diminution de la fluorescence constatée sur des cellules de <i>Pseudomonas putida</i> marquées avec leur sonde lors de l'utilisation d'un tampon d'hybridation de plus en plus concentré en formamide.	86
Figure 37 : Représentation schématique du réseau de micro-aimants.	88
Figure 38 : Résultats obtenus pour des hybridations avec la sonde <i>Pseudomonas putida</i> sur les 3 souches contrôle à 53 °C et 66 °C pour un tampon d'hybridation contenant 80 % de formamide.	89
Tableau 6 : Résumé des résultats obtenus en hybridation in situ magnétique.	89
Figure 39 : Observation en microscopie électronique à balayage d'une bactérie <i>Escherichia coli</i> marquée par MISH (53 °C 80% formamide) (flèche noire = nanoparticule magnétique de 50 nm)	91
Figure 40 : Comparatif des données obtenues en qPCR sur le gène 16S pour les différentes fractions après marquage à 53 ou 66 °C et récupération des fractions magnétiques (+) et non magnétiques (-) par utilisation d'un microsystème magnétique.	93
Figure 41 : Représentations schématiques des différentes conditions testées présentées dans le Tableau 3 et les figures 43 et 44.	98
Figure 42 : Résultat d'hybridation fluorescente par HCR sur <i>Escherichia coli</i> avec la sonde Eub338 (Eub-I-b).	98
Figure 43 : Résultats d'hybridation in situ magnétique couplée à une approche HCR.....	100

Figure 44 : Résultats d'expérimentations en FISH utilisant les sondes initiatrices modifiées Ppu, ACA652 et ECO1167.....	102
Figure 45 : Résultats d'expérimentations d'hybridation HCR magnétique en utilisant les sondes initiatrices Ppu-I, ACA652-I et Eco1167-I.	103
Figure 46 : Abondances des bactéries dans les fractions négatives (-) et magnétiques (+) récoltées lors des expériences de capture en utilisant l'approche HCR pour le marquage magnétique des échantillons.....	104
Figure 47 : Comparaison des résultats de capture pour des marquages avec MISH et HCR.....	106
Figure 48 : Contrôle de la taille des produits PCR (taille théorique ≈ 460 pb), par électrophorèse sur gel d'agarose, obtenus sur l'ADN extrait des différentes fractions lors de tris magnétiques sur microsysteme.....	117
Figure 49 : Représentation de type Krona de données 16S annotées via le pipeline Kraken-metagenomic de la fraction 1 avec une lyse directe des cellules extraites avant la réaction d'amplification par PCR.....	118
Figure 50 : Abondance relative des séquences annotées au niveau du genre sur les fractions 1 (inlet) 2 (Neg) et 3 (Mag) récoltées pour des suspensions supplémentées avec <i>Pseudomonas</i> et <i>E.coli</i> et marquées par MISH avec les sondes correspondantes, à 53 ou 66 °C.	120
Figure 51 : Index de Simpson calculé pour les différents échantillons récoltés lors des expériences de tri.....	121
Figure 52 : Analyse en composante principale (ACP) entre les différentes fractions récupérées lors des expériences d'enrichissement.	122
Figure 53 : Analyse ACP incluant les données sur les bactéries non-cibles (extraites des fractions 3 (magnétiques) et des fractions 1 (entrée)).	124
Figure 54 : Abondance relative des séquences annotées au niveau du genre sur des échantillons de sol triés avec un marquage de type HCR ciblant <i>Pseudomonas putida</i>	126
Figure 55 : Indice de Simpson calculé pour les différentes fractions récoltées sur des échantillons marqués par HCR.	126
Figure 56 : Analyse en composante principale sur les données 16S des différentes fractions obtenues après un marquage de type HCR sur un sol enrichi avec <i>Pseudomonas putida</i>	127
Figure 57 : Analyse ACP des résultats d'annotation sur des échantillons marqués par HCR ainsi que les données sur les bactéries non-cibles (extraites des fractions 3 (magnétique) et des fractions 1 (entrée)).	129
Figure 58 : Schéma illustrant le principe de l'utilisation de plusieurs sondes initiatrices en parallèles pour augmenter la sensibilité du marquage par HCR.	131
Figure 59 : a) Séparation de type "batch" : le volume introduit est limité et l'efficacité de séparation et évaluées en fin de traitement. b) Séparation sous flux continu.....	135
Figure 60 : Séparation d'entités magnétiques et non magnétiques en continu sous l'action d'un champ non homogène généré perpendiculairement à la direction du flux. (Pamme, 2007)..	135
Figure 61 : Exemples de microsystemes de tri en flux continu intégrant des structures en matériaux ferromagnétiques doux aimantées par une source de champ extérieure.	137
Figure 62 : Structure du microsysteme développé. Les bandes magnétiques situées en fond de canal sont réalisées en matériau polymère nanocomposite.	138
Figure 63 : Identification des forces en jeu (projection dans le plan des rails magnétiques). Le piégeage des billes magnétiques le long des rails est possible dans le cas où la composante de la force magnétique perpendiculaire au rail $F_{m\perp}$ est plus grande que celle de la force de drag $F_{d\perp}$.	

Le guidage de la particule le long du rail est alors assuré par la composante $F_{d//}$ de la force de trainée.	140
Figure 64 : Fabrication d'un canal microfluidique en PDMS par lithographie douce.	142
Figure 65 : Représentation schématique de la formation de groupements silanols sur des substrats (verre, PDMS, silicium...) par traitement plasma, permettant le scellement de la puce microfluidique.	142
Figure 66 : Observation en microscopie électronique à balayage des particules de Fer Carbonyle (A) et NdFeB (B) utilisées dans le cadre de nos travaux.	144
Figure 67 : Approche « doctor blade » pour la fabrication de microstructures en PDMS composite.	145
Figure 68 : Intégration de piliers magnétiques dans un microcanal par l'approche « doctor blade » (d'après Faivre et al.)[258].	146
Figure 69 : Etape de planarisation consécutive à l'obtention de piliers magnétiques en PDMS dopé.	147
Figure 70 : Injection de matériau conducteur dans des microcanaux en PDMS pour la réalisation d'électrodes épaisses en vue du tri de particules par diélectrophorèse [265].	149
Figure 71 : Bande magnétique d'épaisseur 50 μm et de largeur 100 μm obtenue par injection de PDMS mélangé à des particules de Fer Carbonyle (80 %) dans un canal perpendiculaire au canal principal.	149
Figure 72 : Fabrication d'un microsystème magnétique par Injection de PDMS composite dans un canal parallèle au canal principal [267].	150
Figure 73 : Procédé de fabrication mis au point pour l'obtention d'un trieur magnétique de cellules tel que présenté Figure 63.	152
Figure 74 : Observation en champ sombre d'une bande de PDMS magnétique obtenue par injection dans un canal microfluidique de 400 μm de large et 50 μm d'épaisseur (pourcentage massique de particules de 66 % pour les deux types de poudres).	155
Figure 75 : A. Dessin (CleWin) du masque définissant la géométrie des moules employés pour l'injection (bandes parallèles de taille 50 ou 100 μm) utilisé à l'étape 1. B. Illustration de l'étape 4: injection de PDMS composite dans un réseau de microcanaux en PDMS collé de façon réversible sur une lame de verre.	155
Figure 76 : Observation des bandes en PDMS magnétique par microscopie optique.	156
Figure 77 : Vérification de l'aimantation des structures magnétiques en NdFeB. Images magnéto-optiques obtenues avant (a) et après aimantation (b).	157
Figure 78 : Observation du microsystème obtenu après assemblage final	158
Figure 79 : A. Courbe d'aimantation obtenue pour un échantillon de FC-PDMS (75 % de particules en pourcentage massique) B. Courbe d'aimantation d'un échantillon de NdFeB-PDMS (66 % de poudre de NdFeB).	159
Figure 80 : Simulations sous Matlab de l'induction magnétique B et du gradient d'induction magnétique $ dB/dz $ calculé pour une coupe 2D réalisée 2 μm au-dessus de bandes en aimants doux (A) ou permanents (B), ainsi que pour une coupe 1D effectuée au milieu des bandes.	161
Tableau 7 : Description des particules magnétiques utilisées.	162
Figure 81 : Particules de 10 μm attirées sur les bandes magnétiques. Bien qu'une observation en fond clair (A) ne permette pas de voir les particules, celles-ci apparaissent de façon beaucoup plus contrastée en champ sombre.	162
Figure 82 : A. Piégeage des particules de 10 μm sur les bords des bandes. B. Piégeage par des bandes magnétiques en matériau doux de particules lâchées en haut du canal, tel que simulé en statique sous Comsol	163

Figure 83 : Test d'attraction de différents types de particules sur les bandes en PDMS composite :	164
Figure 84 : Présentation du système expérimental.	165
Figure 85 : Résultats des tests de déviation des particules magnétiques.....	166
Figure 86 : a: Schéma de principe d'un dispositif intégrant des structures magnétiques en chevrons b. Photographie d'un dispositif réalisé en FC-PDMS.....	167
Figure 87 : Autre exemple de structure à base de PDMS composite	168
Figure 88 : Nouveau procédé de fabrication mis au point.	169
Figure 89 : Observations réalisées sur un microsystème réalisé à l'aide du protocole de fabrication couplant les techniques de « doctor blade » et d'injection de PDMS.....	170
Figure 90 : Image optique d'un réseau de micro-aimants plat obtenu à partir du nouveau procédé.	171

Liste des abréviations

- A : Adénine
- ACP : Analyse en composante principale
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN (m/r) : Acide ribonucléique (messager/ribosomique)
- BSA : *Bovine serum albumin*
- C : Cytosine
- DGGE : *Denaturant Gradient Gel Electrophoresis*
- dNTP : *désoxy Nucleotide Tri Phosphate*
- EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
- FACS : *Fluorescent activated cell sorter*
- FC : Fer Carbonyl
- FISH : *Fluorescent in situ Hybridization*
- *g* : Constante gravitationnelle
- G : Guanine
- Gfp : *Green fluorescent protein*
- HCR : *Hybridization Chain Reaction*
- HRP : *Horseradish peroxidase*
- LNA : *Lock Nucleic Acid*
- MACS : *Magnetic activated cell sorter*
- MEB : *Microscopie Electronique à Balayage*
- MISH : *Hybridation in situ Magnétique*
- MOIF : *Magneto-Optical indicator Film*
- NaCl : Chlorure de sodium
- NCBI : *National center for Biotechnology Information*
- Pb : Paires de bases
- PBS : Tampon phosphate salin
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- PDMS : Polydiméthylsiloxane
- PFA : Paraformaldéhyde
- PGMEA : Propylène Glycol Monométhyl Éther Acétate
- qPCR : *Real time Polymerase Chain Reaction*
- RDP : *Ribosomal Database Project*
- RIE : *Reactive-Ion Etching*
- RISA : *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*
- Rpm : Rotation par minute
- *Rrl* – 23S : gène *rrl*. Codant pour la grande sous unité des ribosomes
- *Rrs* – 16S : gène *rrs*. Codant pour la petite sous unité des ribosomes
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
- T : Tyrosine
- TMP : *Thermo magnetic patterning*

Introduction Générale : Les bactéries environnementales

Les bactéries (formant avec les Archaea et les eucaryotes une des trois branches du vivant) constituent l'une des formes de vie les plus anciennes de notre planète. Leur fort potentiel évolutif leur a permis de s'implanter et croître dans tous les écosystèmes tels que les océans [1], les sols [2], les lacs et les rivières, l'air jusque dans les couches les plus élevées de l'atmosphère [3]. Elles sont aussi présentes dans des écosystèmes que l'on qualifiera de contraignants voir extrêmes comme les grands fonds marins [4], les régions désertiques [5], les pôles [6], les environnements très acides [7] et ceux soumis aux radiations ionisantes [8].

Décrits comme les premières formes de vie sur Terre, les procaryotes (bactéries et archées) ont colonisé la planète, provoquant des changements majeurs à l'origine de l'apparition des autres formes de vie [9]. Leurs capacités métaboliques leur permettent de jouer un rôle fondamental dans tous les grands cycles biogéochimiques, ceux du carbone, de l'azote, du soufre et de l'oxygène, formant ainsi un élément clé de la décomposition de la matière organique sous une forme assimilable par d'autres organismes [10]. Leur nombre à l'échelle de la biosphère est aujourd'hui estimé à 5×10^{30} cellules [11], ce monde microbien constituant le plus important réservoir de diversité génétique.

Beaucoup de bactéries vivent en association plus ou moins bénéfiques avec d'autres organismes tels que les plantes [12], les animaux [13] et l'homme [14] où de plus en plus de travaux s'intéressent aux microbiotes du tube digestif, de la peau, etc... [15,16]. Si quelques bactéries sont pathogènes et ont été responsables par le passé de terribles pandémies d'autres ont développé des associations qui vont moduler le développement [13], les processus digestifs [17] ainsi que l'immunité de l'organisme [18] auquel elles sont associées [19].

Les bactéries sont des microorganismes principalement unicellulaires de taille micrométrique ayant une forme de sphères, de bâtonnets ou spiralées [20,21]. A l'opposé des cellules eucaryotes ce sont des cellules dépourvues de noyau dont le matériel génétique est libre dans le cytoplasme. L'essentiel de leur information génétique est porté par le chromosome, le reste par des éléments génétiques accessoires tels que les plasmides. Le chromosome porte les gènes essentiels qui vont permettre à la bactérie de vivre et se reproduire, définissant son identité [22]. Les plasmides sont

des éléments génétiques plus petits que les chromosomes, majoritairement circulaires, quelques-uns linéaires et ne sont généralement pas obligatoires à la survie de la bactérie ; Ils portent toutefois des gènes qui confèrent un avantage adaptatif à leur hôte qui peuvent s'avérer essentiels dans certaines conditions environnementales [23,24].

L'homme a depuis très longtemps utilisé sans le savoir les formidables propriétés métaboliques des microorganismes, notamment pour sa nourriture pour préparer pain, fromages et boissons fermentées [25]. Cependant il faudra attendre le XVII^e siècle pour qu'Antony van Leeuwenhoek réalise les premières observations visuelles des microorganismes avec un microscope rudimentaire et les travaux de Pasteur pour que la microbiologie commence à se développer comme une discipline scientifique à l'égal de la biologie végétale ou animale, de la botanique, de la physiologie etc. La microbiologie a alors permis de mettre en avant le rôle crucial des microorganismes dans l'environnement et leur fort potentiel pour les biotechnologies. L'homme a domestiqué, amélioré, modifié des microorganismes [26] pour en exploiter les enzymes [27], leur faire produire des molécules d'intérêt pharmaceutique [28], du gaz [29] et de l'énergie [30,31].

Les microorganismes trouvent aussi un intérêt dans des problématiques environnementales et sont de plus en plus utilisés comme bioindicateurs [32] de la santé d'un écosystème. L'effet stimulant de certains, qualifiés de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) pour les cultures est de plus en plus utilisé [33], comme les propriétés cataboliques d'autres microbes exploités dans les procédés de traitements des pollutions par des hydrocarbures [34] ou d'autres composés toxiques comme les pesticides [35]. Le traitement des eaux usées [36] en stations d'épuration est également un processus relevant de l'activité des bactéries, permettant la remise en circulation dans le circuit de consommation des eaux ainsi régénérées.

La grande variété de fonctions chez les bactéries est le résultat d'une histoire évolutive longue qui a permis le développement de cet imposant réservoir fonctionnel. Mutations ponctuelles [37] et transferts horizontaux de gènes [38] sont à l'origine de la diversité génétique bactérienne. Les mutations résultant d'erreurs enzymatiques commises lors de la réplication de l'ADN vont être responsables d'une évolution lente alors que le transfert d'information génétique (opérons, gènes individuels ou simplement portions de gènes) peut en un seul événement de transformation,

conjugaison ou transduction modifier en profondeur la *fitness* (valeur adaptative) de la cellule réceptrice.

La microbiologie en tant que domaine scientifique s'est développée avec l'étude des bactéries pathogènes en milieu médical [39,40]. Ce n'est que plus tard que s'est réellement ajouté un volet environnemental à cette discipline. La microbiologie environnementale est fortement teintée d'écologie microbienne, le décryptage taxonomique des microbiotes [41], l'inventaire de leurs gènes [42] et le niveau auquel ils sont exprimés [43] devant conduire *in fine* à la compréhension des interactions qu'ils établissent entre eux et avec leur environnement biotique et abiotique. De cette compréhension fondamentale découlera celle du fonctionnement des écosystèmes avec la possibilité qui serait alors offerte à l'Homme de corriger les dysfonctionnements tels que ceux occasionnés par les changements climatiques ou par d'autres perturbations anthropiques.

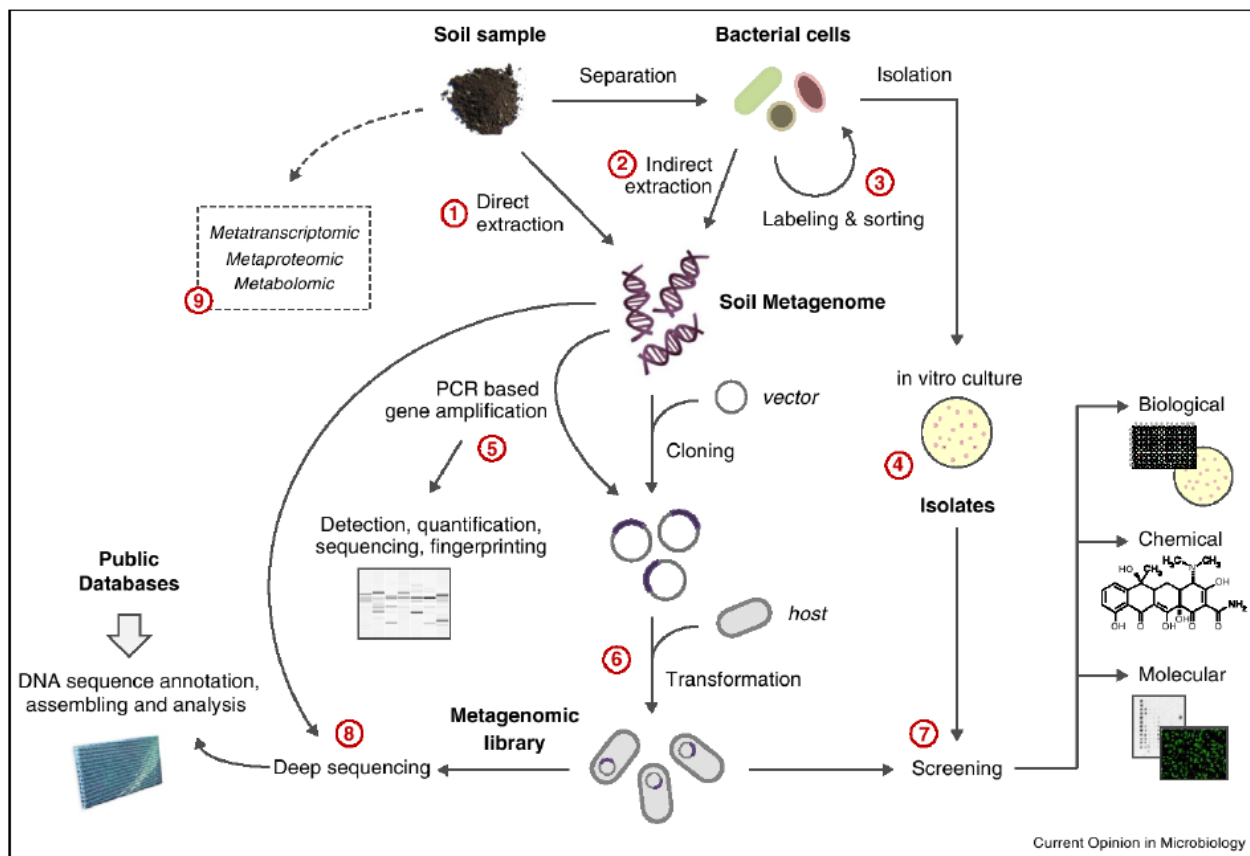


Figure 1 : Aperçu des différentes approches existantes pour l'étude de la biodiversité microbienne.

L'ADN métagénomique est obtenu par une extraction directe (1) ou indirecte après extraction des bactéries (2). Des populations spécifiques peuvent être sélectionnées par une méthode de tri cellulaire (3). Lorsque possible la culture *in vitro* (4) permet de décrypter tout le potentiel d'une souche (7). Le métagénome du sol peut être analysé au niveau

d'un gène d'intérêt 16S qui sera amplifié par PCR et/ou cloné dans un vecteur afin de construire une librairie metagénomique (6). Chaque clone de la librairie pourra être analysé indépendamment (7) ou alors directement séquencé (8). D'après [44]

Dès les débuts de la microbiologie environnementale, les objectifs prioritaires se sont focalisés sur la classification des bactéries, tentant en parallèle d'évaluer leur diversité tout en abordant leur physiologie. Ces travaux ont été réalisés à partir de souches pures cultivées *in vitro* à partir d'échantillons environnementaux étalés sur des milieux de culture [45]. La discipline s'est progressivement enrichie des nouveaux outils de la biologie moléculaire [46]. La génomique microbienne a réellement pris son essor avec le séquençage de génomes bactériens complets [47] et le développement de la bioinformatique [48]. Ces outils ont aussi révolutionné la classification bactérienne, la taxonomie reposant désormais sur des concepts de phylogénie, prenant en compte l'histoire évolutive des génomes. Il est alors apparu que la microbiologie s'était développée exclusivement sur l'étude d'isolats qui ne représentent qu'une infime proportion de la diversité bactérienne, celle-ci étant majoritairement constituée de bactéries récalcitrantes à la culture dans les conditions de laboratoire [11]. S'est alors développée ce qui constitue une nouvelle discipline basée sur l'étude de constituants bactériens (ADN, ARN, protéines, métabolites) directement extraits de l'environnement. La microbiologie environnementale est donc aujourd'hui constituée par 2 types d'approches, celles relevant des isolats et celles indépendantes de la culture *in vitro* [49].

I. L'approche culturelle

L'approche culturelle est donc historiquement la première méthode utilisée pour étudier les microorganismes. Après avoir prélevé un échantillon de l'environnement à étudier, celui-ci est étalé sur un ou plusieurs milieux de culture solidifiés qui, selon leur composition permettront à certaines espèces microbiennes de se développer pour former des colonies, chacune devant résulter de la multiplication clonale d'une seule cellule initiale. C'est grâce à l'accumulation de cellules identiques après sous culture en milieu liquide ou sur milieu solide de ces cultures pures, que peut être générée suffisamment de biomasse pour réaliser les études de physiologie, de génétique, de taxonomie [50]. C'est sur ce principe que s'est développée la microbiologie industrielle, comme par exemple la culture en réacteurs de plusieurs centaines de m³ de souches d'actinobactéries pour produire la plupart des antibiotiques présents aujourd'hui sur le marché

[51]. Toutefois, les conditions nutritionnelles mais aussi physico-chimiques susceptibles d'être proposées aux bactéries au laboratoire sont loin de celles existant *in situ*. Certaines ne se développeront que dans le cadre de consortia du fait de relations trophiques obligatoires [52]. Il en résulte que seule une infime proportion de la biodiversité bactérienne compte aujourd'hui des représentants cultivés *in vitro*, cette valeur ne dépassant pas 0,1 % pour le sol [11]. Des approches alternatives pour décrypter les microbiotes étaient donc nécessaires avec la perspective que les progrès qui pourraient être réalisés sur la physiologie de ces microorganismes non cultivés puissent permettre de définir les conditions de leur multiplication *in vitro*.

II. Les approches indépendantes de la culture *in vitro*

Face aux limites de l'approche culturale qui laissait de côté une majeure partie de la diversité bactérienne, la microbiologie a dû se doter de nouveaux outils d'analyse. Ceux-ci abandonnent la multiplication cellulaire *in vitro* au profit de l'extraction directement de l'environnement naturel de certains de leurs composants en vue de les exploiter pour analyser non plus un individu (issu d'une cellule) mais une communauté. Nous ne traiterons ici que de ce qui a été réalisé avec l'ADN même si des travaux sont aussi basés sur l'exploitation de l'ARN, des protéines, des métabolites, etc..., pour répondre chacun à des questionnements scientifiques spécifiques.

L'extraction et l'analyse du support de l'information génétique qu'est l'ADN à partir d'un ensemble de cellules dépassent le niveau individuel pour atteindre celui de la communauté, justifiant ainsi le terme de métagénomique qui a été attribué à cette approche [53]. Profitant des progrès considérables de la biologie moléculaire l'approche métagénomique peut prendre en compte des bactéries jusque-là ignorées car appartenant à la fraction non cultivée.

Le premier défi qu'a eu à relever cette discipline a été la mise au point de techniques d'extraction et de purification des acides nucléiques à partir d'échantillons environnementaux. Suivant les milieux et leur complexité physico-chimique les difficultés seront plus ou moins ardues à surmonter [54]. Deux stratégies sont possibles basées l'une sur la lyse *in situ* suivie de la purification de l'ADN, l'autre sur une extraction préalable des cellules sur gradient de densité d'un polymère (généralement du Nycodenz) avant lyse des bactéries et purification de l'ADN [54]. Les 2 méthodes présentent avantages et inconvénients en termes de quantité, pureté et

qualité de l'ADN extrait qui pourra être utilisé comme matrice dans des réactions PCR pour amplifier des gènes utilisables en taxonomie, phylogénie, en caractérisation de communautés (par exemple les gènes *rrs* (16S) et *rrl* (23S)) après séquençage [55] ou analyse de profils RISA ou DGGE [56]. Des gènes fonctionnels peuvent également être amplifiés pour en déterminer la diversité, définir leur origine et leur tendance à être transférés horizontalement [57]. L'ADN métagénomique extrait peut aussi être cloné afin de constituer des banques d'ADN métagénomique qui seront criblés phénotypiquement ou par sondes moléculaires avec l'objectif d'identifier des enzymes ou des métabolites de leur hôte d'origine et exprimés de façon hétérologue dans le nouvel hôte bactérien (le plus souvent *E. coli*) [58]. Enfin, l'ADN métagénomique peut être directement soumis au séquençage sans étape préalable d'amplification PCR. Suivant les technologies de séquençage utilisées, la complexité du métagénome, les outils bioinformatiques utilisés pour analyser les séquences produites, des génomes complets peuvent être reconstruits [59], première étape de véritables études de génomique appliquées aux communautés.

A défaut, les études d'exploitation des ADN environnementaux, avec ou sans étape PCR précédant le séquençage sont aujourd'hui très plébiscitées dans un contexte d'écologie microbienne pour tenter d'assigner les nouvelles séquences à des gènes fonctionnels, d'accroître le décryptage taxonomique des microbiotes [60]. Ces travaux qui relèvent d'un véritable inventaire devraient permettre à terme de corréler structures taxonomiques et fonctionnelles des microbiotes aux paramètres environnementaux et caractériser des bioindicateurs de situations particulières, comme par exemple des pollutions chimiques [32].

De tels objectifs, comme ceux encore plus ambitieux de déduire le fonctionnement des écosystèmes de la connaissance des interactions entre microorganismes requièrent la quasi-exhaustivité dans la prise en compte des différentes populations constituant un microbiote. Le défi est gigantesque, en particulier pour des écosystèmes comme les sols où chaque gramme est colonisé par plus d'un milliard de cellules bactériennes appartenant à un nombre indéfini d'espèces mais certainement supérieur à 1 million [41,61]. Qui plus est la plupart de ces espèces ne comptent qu'un nombre très limité de cellules, constituant une biosphère rare particulièrement difficile à prendre en compte [62].

L'approche métagénomique montre donc ses limites lorsqu'elle se confronte aux environnements les plus complexes tels que les sols. A cette difficulté conceptuelle liée au niveau de diversité microbienne bien supérieur à celui estimé avant l'arrivée des techniques moléculaires s'ajoutent les biais méthodologiques dus notamment à l'extraction de l'ADN environnemental [63]. Inefficacité des traitements de lyse sur certaines cellules, notamment les formes de résistance [64], adsorption de l'ADN libéré sur les composants du sol, notamment les argiles [65], pertes d'ADN lors des étapes de purification sont les principales causes de ces biais [66]. Nombre d'articles dans la littérature démontrent l'importance de ces limitations et tentent, sans succès d'y remédier en proposant de nouvelles méthodes d'extraction tout aussi inefficaces. Le problème est tel que l'on est en droit de s'interroger sur la réelle représentativité qu'offre l'ADN extrait du microbiote et séquencé de ce qu'était initialement sa structure taxonomique et fonctionnelle dans l'échantillon avant son traitement [67].

L'approche métagénomique couplée au séquençage même massif de l'ADN extrait du sol n'a pas le potentiel à elle seule pour permettre le décryptage complet des écosystèmes microbiens telluriques. Inventaires taxonomiques et fonctionnels exhaustifs des microbiotes tout comme la reconstruction complète d'une partie significative des génomes bactériens sont inenvisageables à court ou moyen terme.

Un inventaire taxonomique complet des populations bactériennes des sols, de leurs gènes nécessite le recours à des approches complémentaires. Parmi celles-ci se positionnent la culture *in vitro*, les autres approches en omics citées précédemment, metatranscriptomique, metaprotéomique, metamétabolomique mais ces dernières sont frappées des mêmes limitations que la métagénomique. Un véritable changement conceptuel est nécessaire, shuntant l'approche basée sur l'individu que représentait la culture d'isolats mais aussi celle sur la communauté des approches meta-omics pour considérer un autre niveau, celui de la population. Un microbiote est une communauté de populations microbiennes différentes et leur nombre très élevé est en grande partie responsable de l'échec des techniques de masse comme la métagénomique et le séquençage même haut débit qui manquent encore de puissance pour toutes les prendre en compte. Fractionner le microbiote pour étudier ses composantes populationnelles individuellement par des méthodes indépendantes de la culture combinerait les avantages de la culture avec celles de la métagénomique. Le niveau cellule unique que proposent déjà les approches répertoriées sous

l'appellation « *single cell genomics* » [68,69] n'est pas adaptée car trop spécifique alors que le niveau population englobant les bactéries réunies au sein d'une même espèce voire d'un même genre serait plus à même de faire évoluer le décryptage étape par étape, population après population. Le défi consiste alors à développer les approches technologiques qui permettront de séparer, récupérer et traiter spécifiquement les populations bactériennes sélectionnées au sein d'un microbiote [70], notamment tellurique.

Relever le défi du tri de populations bactériennes spécifiques au sein d'une communauté bactérienne complexe pour les analyser par des approches issues de la métagénomique a constitué l'objectif de ce travail de thèse. Il s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire par un précédent doctorant dans le cadre d'un projet ANR [71].

Conceptuellement, fractionner un microbiote pourrait se faire sur des critères taxonomiques (identité des microorganismes) ou fonctionnels (les fonctions qu'ils réalisent). Cependant, les informations concernant les fonctions codées par les gènes détectés dans les métagénomes sont très fragmentaires, la plupart de ces gènes codant des protéines sans fonctions identifiées. Au niveau taxonomique les données découlant de l'analyse des séquences des gènes ribosomiques obtenues après amplification PCR de l'ADN métagénomique sont moins disparates justifiant d'initier une approche de fractionnement en ciblant espèces ou genres bactériens. L'ubiquité des gènes ribosomiques, leur structure faite de zones à séquences très conservées encadrant d'autres zones dont le niveau de divergence entre bactéries est inversement corrélé à la proximité phylogénétique définit pour chaque population une signature moléculaire spécifique. L'hybridation moléculaire basée sur les propriétés physiques de réassociation de l'ADN en fonction de la similarité des séquences offre un outil de choix pour exploiter les signatures moléculaires de chaque population à des fins de marquage spécifique des cellules dans le cadre des techniques d'hybridation *in situ*. Enfin, si la fluorescence a largement été utilisée pour détecter et isoler les cellules bactériennes hybridées son application à des suspensions bactériennes extraites d'environnements complexes comme les sols pose problème du fait de l'autofluorescence de contaminants résiduels.

Ces différents éléments nous ont donc conduits à privilégier le développement d'une approche de fractionnement des microbiotes sur des critères de taxonomie, en utilisant les propriétés de l'hybridation moléculaire pour marquer les populations visées avec des sondes ciblant les ARN

ribosomiques. Mais nous avons délaissé la fluorescence au profit des propriétés magnétiques de nanoparticules fonctionnalisant les sondes nucléiques pour capturer les cellules bactériennes hybridées sur un réseau de micro-aimants lors du passage de l'échantillon dans un système microfluidique.

Le premier chapitre présente une étude bibliographique de la littérature concernant les différentes approches de tri cellulaire disponibles. C'est à partir de cette analyse que seront justifiés le choix de développement d'une stratégie de tri basée sur l'hybridation moléculaire *in situ* et celui du magnétisme comme principe de capture des bactéries.

Seront présentés dans un second chapitre les différents travaux amont réalisés pour développer sur des systèmes simplifiés les différentes étapes du protocole. Spécificité et sensibilité de l'hybridation seront déterminées sur du matériel biologique bien caractérisé (isolats bactériens et leur ADN), avec un recours à la fluorescence pour valider par comparaison les propriétés de séparation du magnétisme après l'hybridation *in situ* réalisée en utilisant les différentes combinaisons possibles entre sondes moléculaires et cibles bactériennes.

Le troisième chapitre décrit les travaux réalisés en intégrant dans les expérimentations de tri les premières suspensions bactériennes extraites d'échantillons environnementaux permettant d'esquisser les premières conclusions sur les potentialités et les limites de cette nouvelle approche.

Plus technologique, le quatrième et dernier chapitre présente les travaux réalisés sur le dispositif de tri microfluidique en vue de modifier son design de façon à renforcer l'intégration microfluidique par l'emploi de polymères composites et permettre le tri en flux continu de cellules bactériennes marquées par des nanoparticules magnétiques.

Une conclusion finale dresse un bilan général de ces travaux et présente perspectives et potentielles utilisations de ces nouveaux outils.

Chapitre 1 : Le tri cellulaire appliqué à l'étude des bactéries environnementales

I. Introduction

La microbiologie se consacre à l'identification et à la caractérisation physiologique et génétique [72,73] des micro-organismes mais aussi à l'étude de leur origine et de leur évolution [74]. L'écologie microbienne vise à comprendre les connexions que peuvent avoir entre eux les microorganismes présents dans un écosystème et avec leur environnement [75]. La finalité des travaux visant les microorganismes est double, fondamentale d'abord pour décrypter la diversité des mécanismes physiologiques, génétiques, écologiques, les caractériser, les identifier et les classer dans une approche phylogénétique. Elle est aussi appliquée en vue d'exploiter industriellement leurs capacités enzymatiques [76] et leurs métabolismes [30,35]. La microbiologie s'est initialement développée grâce à ce qui est appelée l'approche culturale qui présente toutefois des limites car seule une infime proportion des microorganismes principalement procaryotes (bactéries et Archaea) est capable actuellement de se multiplier *in vitro* [77] laissant ignorée et inexploitée la majeure partie de la biodiversité microbienne [78].

L'étude des microorganismes non cultivés/non cultivables a pu se développer avec l'apparition et l'évolution des technologies basées sur l'étude des acides nucléiques directement extraits de l'environnement, court-circuitant ainsi l'étape d'isolement. L'écologie microbienne a été la discipline qui a le plus bénéficié de ces approches qualifiées de « metagénomiques ». En appliquant la PCR et le séquençage haut débit de l'ADN et de l'ARN sur des échantillons environnementaux, des avancées spectaculaires ont été réalisées concernant par exemple l'identification de nouveaux microorganismes et la caractérisation des fonctions codées dans leurs génomes [73,79,80].

Mais ces approches ne sont pas non plus exemptes de limitations où aux biais méthodologiques s'ajoutent des difficultés conceptuelles liées à un niveau de diversité extrêmement élevé avec une biosphère rare difficilement atteignable du fait d'un manque de sensibilité d'outils pourtant très

performants [62]. Nul n'est capable de préciser le niveau de représentativité de la structure taxonomique et fonctionnelle du microbiote atteint par l'ADN extrait et séquencé. Comment alors envisager déterminer la complémentarité des activités métaboliques des partenaires microbiens associés à la réalisation d'une fonction, s'il n'est pas possible de relier les gènes détectés dans le metagénome à des individus taxonomiquement identifiés. On réalise alors la difficulté d'exploiter des résultats de séquençage metagénomique dans une démarche d'écologie microbienne qui cherche à comprendre les interactions entre les différentes composantes d'un microbiote.

Après plus de 20 années de développements de la metagénomique et du séquençage, il apparaît aujourd'hui que ces approches ne seront pas en mesure de répondre seules au défi que représente le décryptage du monde microbien dans beaucoup d'écosystèmes et en particulier dans le sol [67]. S'il ne fait aucun doute que la metagénomique doit rester un outil central dans la panoplie de l'écologiste microbien, elle se doit d'être complétée de méthodes palliant ses limites. La compréhension de l'écologie microbienne passe par une combinaison d'approches pluri et inter disciplinaires, et nécessitera probablement les efforts combinés de nombreux laboratoires, ceux-ci pouvant par exemple confronter différentes analyses menées sur des échantillons de référence [67]. Méthodologiquement, ces différents échantillons devraient être traités en combinant approches metagénomiques avec celles de la culture *in vitro* pour lesquelles seraient sollicités des spécialistes de taxons couvrant les différentes branches de l'arbre phylogénétique. En complément des solutions envisagées plus haut, celle consistant à explorer pas à pas la diversité d'un microbiote fait aussi son chemin du fait du développement des techniques permettant de trier et séparer les cellules les unes des autres [81].

Dans le cadre de cette thèse, nos travaux visaient à la mise en place d'une technologie de marquage de bactéries différenciées sur une base taxonomique et d'appliquer sur les populations sélectionnées et séparées du reste de la communauté les outils de metagénomique et de séquençage.

Le tri préliminaire des cellules présente l'intérêt de conserver intactes les structures et donc celles de leur ADN ce qui devrait favoriser la reconstruction *in silico* des génomes bactériens présents dans ces metagénomes à la complexité très réduite. En ciblant successivement différents taxons grâce à des protocoles aisément transposables d'un groupe à un autre, un inventaire exhaustif du

microbiote pourrait être envisagé sur le long terme ouvrant la voie au décryptage du mode de fonctionnement de l'écosystème.

Dans ce chapitre, nous aborderons les concepts et les méthodes de marquage des bactéries et de tri des cellules marquées afin de réaliser l'enrichissement sélectif de ces cellules à partir d'un mélange complexe. A partir du descriptif des différentes approches disponibles pour le marquage des bactéries nous justifierons le choix de l'hybridation *in situ* en en présentant ses atouts mais aussi ses limites. De façon similaire seront présentées les potentialités des différents types de trieurs qui ont justifié les choix effectués.

II. Biodiversité bactérienne dans un sol

Le sol est l'un des environnements les plus complexes et est un réservoir majeur de la biodiversité bactérienne. Malgré cette richesse biologique, l'étude des microorganismes colonisant ce type d'écosystème reste aujourd'hui très compliquée. Ce point peut être expliqué par les biais méthodologiques (limites de l'approche culturale, extractions d'ADN biaisées,...) pour l'étude des bactéries mais aussi par le dynamisme et la complexité de l'écosystème en lui-même qui est soumis en permanence à des perturbations pouvant impacter l'organisation des populations bactériennes s'y développant [82].

A. Structure et composition des sols

Le sol est à l'interface entre l'atmosphère, la lithosphère et l'hydrosphère. Les sols sont les écosystèmes dans lesquels les bactéries sont les plus abondantes et les plus diverses. Il est estimé qu'il est possible de trouver dans un seul gramme de sol environ 10^9 cellules microbiennes, parmi lesquelles entre 1000 et 10 000 000 d'espèces différentes [41,55,61,77,83].

Les composants du sol sont regroupés dans quatre groupes : les minéraux, la matière organique, l'eau et l'air.

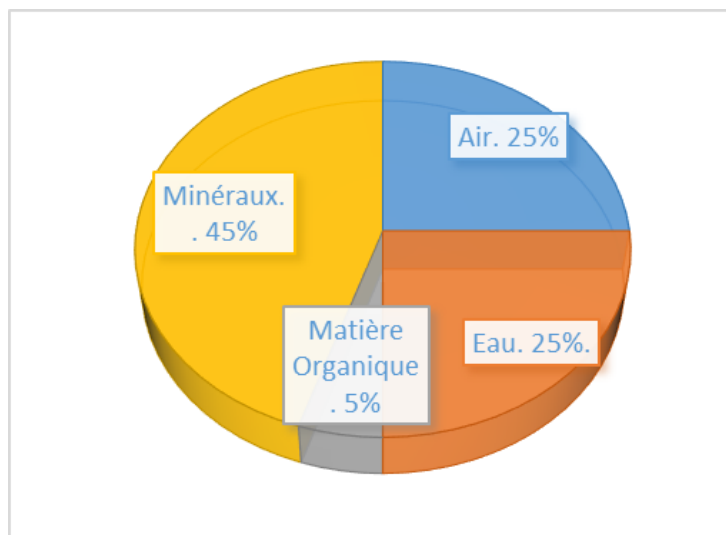


Figure 2 : Proportion volumique des différents groupes dans lesquels sont classés les composants d'un sol.

1) La fraction minérale

La fraction minérale est caractérisée par le type de roche mère à partir de laquelle le sol s'est formé. La fraction minérale d'un sol est constituée de minéraux primaires (quartz, silicates) provenant de la roche mère, et principalement caractérisée d'autres minéraux dits secondaires tels que les argiles et les oxydes libres. Le sol se forme au cours des années par différents processus de désagrégation physique qui fractionnent progressivement les roches auxquels se conjuguent des processus chimiques mettant en jeu différents facteurs tels que l'eau, l'oxygène, les acides minéraux ou organiques qui conduisent à la modification de la structure minérale du sol et la formation des minéraux secondaires. On distingue au sein de la fraction minérale deux grands groupes de particules définis d'après leur taille, avec d'abord la terre fine, faite de particules d'une taille inférieure à 2 mm incluant les différents types de sable (2 mm à 50 μm), les limons (50 μm à 2 μm) puis la fraction fine avec des particules d'une taille < 2 μm (aussi appelée *argile*). Cette répartition des particules selon leur taille définira la texture du sol.

2) La fraction organique

La matière organique participe aussi à la structure du sol grâce à son interaction avec les particules minérales. La matière organique a plusieurs origines, pouvant provenir des différents déchets des organismes ayant été en contact avec le sol ou de leurs sécrétions. On distinguera la matière organique fraîche à l'origine de l'humus formé de débris végétaux et animaux de la matière organique humifiée non liée aux argiles ou aux oxydes métalliques et qui intègre la biomasse microbienne [84].

La matière organique fraîche, subit une première décomposition, d'origine microbienne, permettant de transformer les diverses molécules complexes en des composés simples. Une partie de ces composés simples sera ensuite intégrée dans des processus de minéralisation ou de transformation en minéraux solubles ou gazeux (CO_2), alors qu'une autre partie servira à la fabrication de nouvelles molécules plus ou moins complexes dont l'ensemble constitue l'humus. Les composés humiques contractent des liens avec les composés minéraux puis se minéraliseront aussi à leur tour mais plus lentement que la matière organique fraîche [85].

3) Structure d'un sol

La structure d'un sol correspond à l'assemblage des différentes particules de sol. Cet assemblage est à la fois macroscopique et microscopique. La structure est déterminée par la répartition entre particules solides et espaces vides occupés par l'air ou l'eau. La structure est fondamentale pour définir des caractéristiques du sol telles que l'aération et sa capacité de rétention de l'eau [84]. Les pores les plus importants auront tendance à être majoritairement composés d'air alors que ceux plus petits ($< 10\mu\text{m}$) seront généralement occupés par l'eau. La structure d'un sol résulte de l'action de différents processus biologiques et physico-chimiques et de l'abondance et la nature de différentes particules fines (argiles, composés organiques, microbiote,...) qui agissent comme un véritable ciment sur les particules du sol entraînant ainsi la formation d'agrégats [86].

Cette structure constituée d'agrégats fait des sols des environnements très hétérogènes dans lesquels se différencient de par les variations de leurs paramètres physico-chimiques (hygrométrie, quantité de nutriments, aérobie/anaérobie, pH, présence d'autres types d'organismes...) de nombreux microenvironnements [85,86]. Les bactéries s'y développent sous

forme de micro-colonies associées aux particules de sols, leur distribution étant très hétérogène conditionnée par la diversité des microenvironnements [87].

4) L'eau et le gaz

L'eau est l'un des acteurs majeurs de la vie d'un sol. En plus de jouer un rôle dans la formation des minéraux secondaires l'eau permet le transport des nutriments nécessaires à la croissance des différents macro- et microorganismes. L'eau, provenant des précipitations mais également d'origine souterraine (nappe phréatique) circule plus ou moins librement dans le sol notamment au travers du réseau de pores. On discernera ainsi l'eau de gravité qui sera entraînée sous l'effet de la pesanteur au travers des pores du sol les plus gros ($> 10 \mu\text{m}$) alors qu'une autre fraction de l'eau provenant des infiltrations circulera par capillarité et sera retenue dans les pores de plus petite taille ($< 10 \mu\text{m}$). La disponibilité en eau et son renouvellement vont conditionner la disponibilité en nutriments et par conséquent la croissance et la survie des microorganismes [88,89].

Les échanges gazeux au sein des sols sont particulièrement dépendants des concentrations partielles en oxygène et en dioxyde de carbone. Ils s'y retrouvent à l'état libre dans l'air piégé dans les pores et également sous forme dissoute dans les diverses solutions aqueuses [84]. Les échanges gazeux sont conditionnés par la structure du sol qui, dans les zones plus profondes, pourront être très limités jusqu'à la création de zones en anaérobiose. La disponibilité en gaz contribuera également à la structuration des microbiotes telluriques et aux activités microbiennes.

B. Extraction des bactéries à partir d'un échantillon de sol

La récupération des acides nucléiques bactériens constituant les metagénomes peut être réalisée par deux types d'approches [63]. L'extraction des ADN peut être directe par lyse totale des organismes présents dans un échantillon puis par séparation et purification de l'ADN extrait. Il est aussi possible d'avoir recours à une approche indirecte, où les microorganismes seront séparés physiquement des particules de sol dans un premier temps avant extraction de leur ADN. Cette approche indirecte est recommandée pour la récupération et le clonage de fragments d'ADN de

très grande taille [90], la détection de microorganismes par hybridation *in situ* [91], ou d'autres études en lien avec la physiologie des microorganismes [92,93]. Dans un contexte de mise au point d'un protocole d'enrichissement en bactéries cibles, seules ces méthodes d'extraction indirectes permettant la récupération des bactéries environnementales sont pertinentes.

L'efficacité de l'extraction des cellules bactériennes est fortement conditionnée à celle consistant à rompre les liens physiques forts les reliant aux particules du sol, leur association avec la matrice organique des particules de sol concernant la plupart des microorganismes. Ce phénomène est en lien avec la production par les microorganismes de substances extracellulaires (polysaccharides, protéines, lipides et acides nucléiques) [94] permettant une forte adhésion, parfois irréversible, des cellules aux particules de sol [95]. Ces caractéristiques imposent aux techniques de récupération des bactéries à partir d'un échantillon de sol d'intégrer une étape de dispersion des particules de sol suivie d'une seconde afin de réaliser la séparation physique des cellules de leur support [96].

La dispersion des particules de sol est cruciale pour rendre disponibles les cellules piégées à l'intérieur d'agrégats [97]. Celle-ci peut se réaliser par l'emploi de méthodes physico-chimiques se basant sur les propriétés de sédimentation différentes entre cellules et particules de sol [95,98]. Des centrifugations lentes des échantillons mis en suspension dans une solution de dispersants comme l'héxametaphosphate de sodium vont permettre de libérer les bactéries emprisonnées dans les agrégats de sol en participant à leur dissolution. Une autre approche se base sur les propriétés d'un gradient de Nycodenz qui permettent de récupérer les bactéries de par leur densité spécifique à la position isopycnique sur le gradient constitué après centrifugation [96,99]. Le traitement subséquent des cellules bactériennes par hybridation *in situ* étant relativement sensible aux contaminants conduit à choisir le protocole Nycodenz comme méthode de choix d'extraction des cellules du fait du plus haut niveau de purification obtenu en comparaison des méthodes alternatives.

III. Le marquage des bactéries

A. Introduction et généralités sur le tri cellulaire

Le tri cellulaire est une approche permettant de séparer physiquement certaines cellules au sein d'un groupe hétérogène de cellules. Le tri doit être réalisé à l'aide d'une technologie qui permet initialement la détection des cellules que l'on souhaite récupérer avant leur séparation et récupération sélectives basées sur des propriétés naturelles ou introduites lors de la préparation des échantillons.

La reconnaissance des cellules à récupérer peut être réalisée selon deux grands types de paramètres. Les particularités des cellules recherchées peuvent être intrinsèques aux cellules, telles que leur morphologie, leurs propriétés optiques ou diélectriques [100]. Certaines cellules sont dotées d'autofluorescence [101], d'autres possèdent un magnétisme intrinsèque [102], autant de particularités de différenciation qui pourront être utilisées pour réaliser leur récupération spécifique. Toutefois, ces propriétés physiologiques, comme pourraient l'être également des éléments de morphologie (réseau d'hyphes par exemple pour les actinobactéries [103]) restreignent la sélection aux taxons qui en sont pourvus sans ouverture possible vers d'autres microorganismes. Afin de pallier ces limitations, des technologies ont été développées de façon à doter les cellules bactériennes ciblées de marqueurs interagissant spécifiquement par le biais de molécules faisant le lien entre marqueur et cellule. Généralement, le marquage des bactéries repose sur des interactions de type ligand/récepteur permettant de cibler des constituants précis de la cellule (ex : anticorps) ou alors une caractéristique spécifique d'un de ses composants (ex : séquence d'ADN). Le marquage des bactéries pourra donc être effectué grâce à une reconnaissance antigène-anticorps (immunomarquage) ou alors par reconnaissance d'une partie de l'information génétique des bactéries grâce à l'utilisation d'un fragment d'ADN simple brin (sonde) qui ira se lier (s'hybrider) avec son complémentaire. Les deux grands types de marqueurs les plus couramment utilisés pour le marquage des cellules sont d'un côté les marqueurs fluorescents et de l'autre les marqueurs magnétiques, chacun ayant un type spécifique de trieur associé [104–107].

Les bactéries ciblées peuvent l'être sur des critères taxonomiques, avec notamment comme objectif de récupérer des microorganismes encore non cultivés [108]. Le marquage peut

également cibler des gènes fonctionnels du fait d'une redondance de ces derniers parmi des microorganismes même éloignés phylétiquement. On peut citer par exemple la production d'enzymes impliquées dans la dégradation de polluants [109] mais d'autres spécificités sont également concernées comme la production de métabolites secondaires [76].

B. L'immunomarquage

L'immunomarquage implique une réaction de type antigène-anticorps régissant les processus immunologiques chez l'homme et beaucoup de vertébrés [110]. Les bactéries arborent à leur surface de nombreux composants antigéniques, susceptibles d'interagir avec des anticorps dirigés contre ces antigènes permettant à l'organisme supérieur de reconnaître et détruire spécifiquement la bactérie ciblée au sein d'un microbiote complexe. Chez *Escherichia coli* on peut citer trois antigènes de surface majeurs, O correspondant à une partie de lipo-polysaccharide, H correspondant à une protéine de la capsule et K correspondant à une flagelline [111]. Ces antigènes peuvent être mis à profit afin de servir de marqueurs distinctifs entre différentes souches bactériennes [112]. La bactérie *Escherichia coli* O157 :H7 par exemple est une bactérie pathogène désignée par son sérotype. Les chiffres associés aux antigènes O et H dans ce cas indiquent que la bactérie est porteuse de l'antigène O numéroté 157 et le l'antigène H numéroté 7.

Il existe deux grands types d'anticorps, les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux. Les antigènes présents à la surface d'un microorganisme peuvent comporter un ou plusieurs sites de reconnaissance (ou épitope) pour l'anticorps. Dans le cas où un anticorps peut reconnaître plusieurs épitopes, on parlera d'anticorps polyclonaux et dans le cas inverse où l'anticorps ne peut reconnaître qu'un seul épitope, on parlera d'anticorps monoclonal. Les anticorps monoclonaux présentent un niveau de spécificité beaucoup plus élevé que les anticorps polyclonaux ce qui peut justifier leur utilisation pour marquer spécifiquement une souche bactérienne bien définie tandis que l'utilisation des anticorps polyclonaux trouvera sa justification pour des applications taxonomiques moins contraintes, c'est-à-dire pour cibler des groupes taxonomiques entre l'espèce ou le genre selon les taxons.

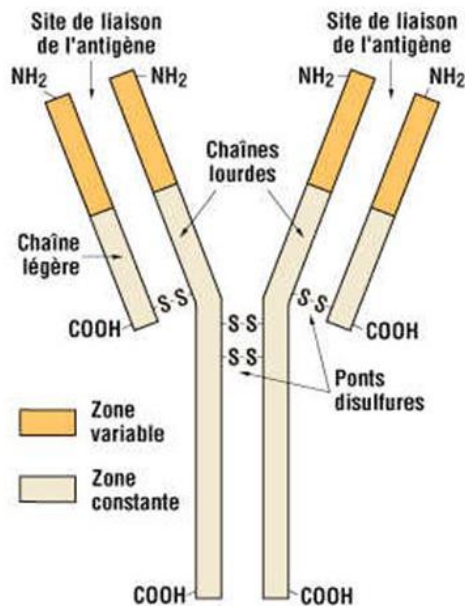


Figure 3 : Structure générale d'un anticorps.

Les anticorps sont formés de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures.

La production de ces anticorps s'effectue généralement par l'intermédiaire d'animaux de laboratoire (rats, souris, lapins sont couramment utilisés) auxquels on inocule l'antigène contre lequel on souhaite produire un anticorps après immunisation de l'animal [113]. La production d'une quantité d'anticorps suffisante pour un marquage est cependant dépendante du nombre d'épitopes antigéniques, ce qui peut être problématique pour les bactéries récalcitrantes, notamment pour toutes celles n'ayant pu être multipliées *in vitro* à ce jour. Le tri cellulaire sera réalisé après couplage des anticorps à des fluorophores (immunofluorescence) ou à des particules magnétiques [114–116] (immuno-magnétisme), ce couplage ne devant pas affecter leur capacité à reconnaître et à se fixer sur leur(s) épitope(s) cible(s).

Les anticorps fluorescents ont été introduits en 1941 [117] pour des applications sur des cellules de mammifères, plus largement par la suite [118] jusqu'à une utilisation en écologie microbienne pour le marquage des microorganismes du rumen en 1957 [119]. Depuis, un grand nombre d'études en microbiologie ont fait appel à l'utilisation d'anticorps, celles-ci restant cependant

principalement réservées à des bactéries à ce jour cultivables et bien caractérisées (principalement des pathogènes humains), même si la littérature rapporte quelques exemples d'autres utilisations [116,120].

L'utilisation d'anticorps pour le marquage de cellules bactériennes présente plusieurs avantages, au rang desquels la possibilité d'obtenir des marquages de spécificité variable (anticorps monoclonaux versus polyclonaux), la simplicité d'utilisation du fait de l'absence de prétraitement ainsi que le maintien de l'intégrité physique des cellules. L'ADN bactérien est donc parfaitement protégé jusqu'au moment où seront appliqués les traitements lytiques dans des conditions similaires à ceux qui peuvent être appliqués aux bactéries développées en culture pure.

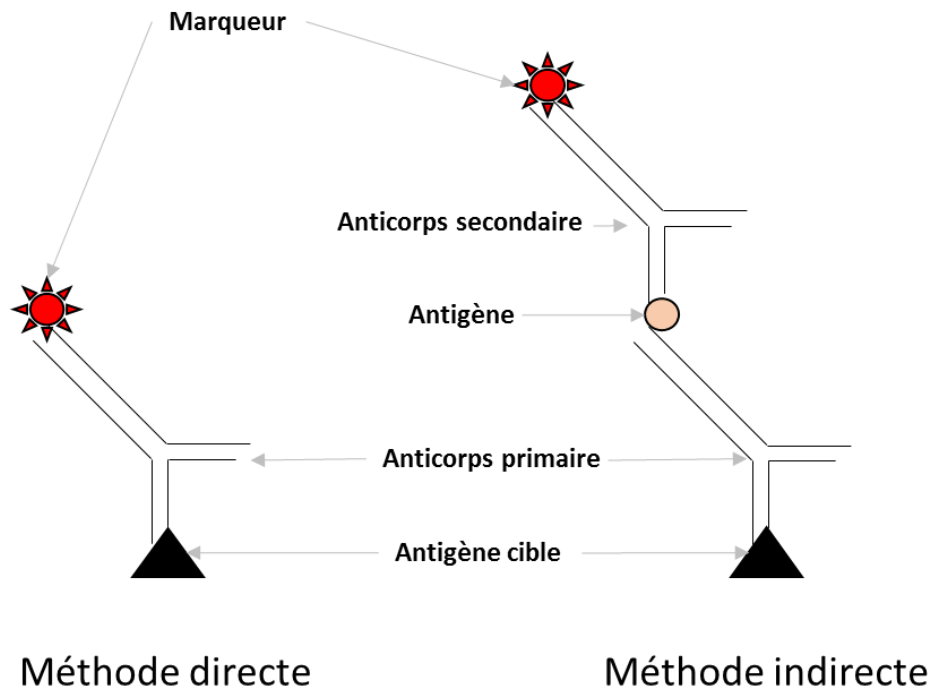


Figure 4 : Principe de l'immunomarquage direct et indirect.

Le marquage direct repose sur l'utilisation d'un anticorps possédant directement le marqueur permettant de mettre en évidence le marquage. En revanche le marquage indirect repose sur l'utilisation d'un anticorps primaire qui ciblera l'antigène et sera lui-même la cible d'un anticorps secondaire porteur du marqueur.

Dans le cas d'un marquage direct, les anticorps utilisés pour détecter l'antigène voulu sont directement marqués alors que dans le cas d'un marquage indirect sera utilisé un anticorps secondaire porteur du marqueur et capable de se lier à l'anticorps dirigé contre l'antigène ciblé (cf. figure 4).

C. Le marquage des acides nucléiques : l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique de biologie moléculaire permettant la détection d'une séquence spécifique d'acides nucléiques, ADN ou ARN. Réalisée en 1969 [121], la première expérience d'hybridation *in situ* impliquait l'utilisation de sondes marquées avec un isotope radioactif pour une détection par micro-autoradiographie. Il aura fallu attendre 1988 pour que cette technique utilisant des sondes marquées avec des isotopes radioactifs soit adaptée à des microorganismes [122]. L'apparition des premiers marqueurs non radioactifs [123] tels que les molécules fluorescentes permet de s'affranchir des conditions de sécurité draconiennes imposées par la radioactivité. Ces marquages à froid n'ont pas tardé à devenir la référence en matière d'hybridation, notamment pour la détection de bactéries spécifiques au sein d'un mélange complexe [124]. Pendant de nombreuses années l'hybridation a été un outil de choix pour les études en microbiologie environnementale [125].

L'hybridation *in situ* utilise comme sondes des fragments d'ADN, d'ARN ou des brins d'acides nucléiques modifiés pour mettre en évidence une séquence spécifique d'ADN ou d'ARN qu'elle soit incluse dans une cellule (ex : hybridation *in situ* en fluorescence ou FISH) ou libre dans l'environnement (ex : puce à ADN : hybridation des ADN cibles aux ADN de capture fixés sur la puce) [126,127]. Cette méthode repose sur l'une des caractéristiques des acides nucléiques à savoir leur propriété à former un duplex stable (s'hybrider) avec une molécule possédant une séquence d'acides nucléiques complémentaire. Compte-tenu des objectifs de nos travaux, nous n'aborderons les processus d'hybridation que dans un contexte de marquage des acides nucléiques contenus dans une cellule, ce qui correspond à la définition *sensu stricto* de l'hybridation *in situ*.

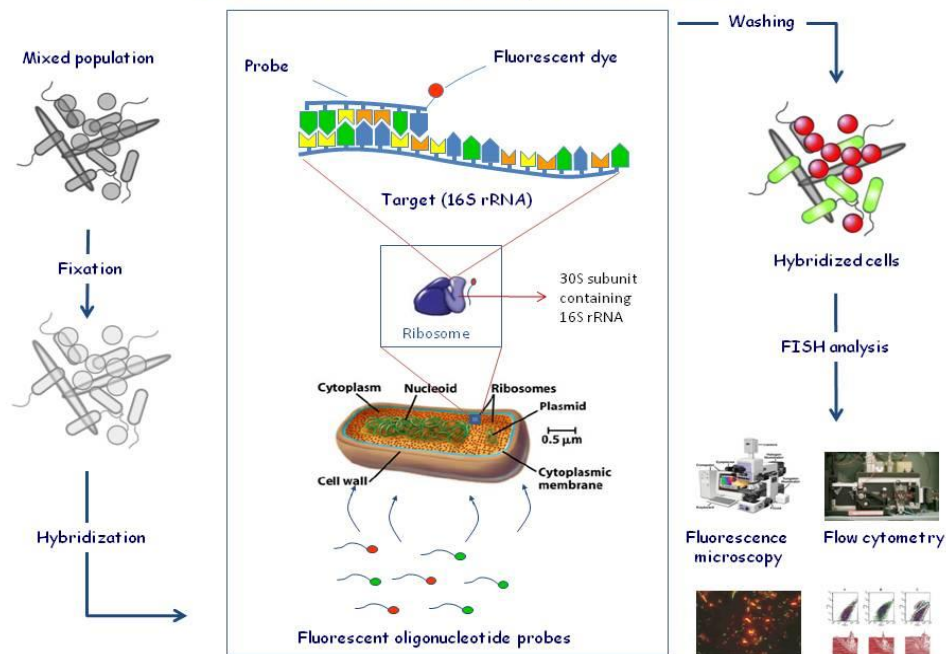
L'hybridation *in situ* présente l'avantage de ne pas nécessiter un isolement préalable des microorganismes à cibler pour définir la séquence des sondes. A ce titre, cette particularité

représente un avantage indéniable par rapport à l'immunomarquage pour lequel, nous l'avons vu, la production d'anticorps est dépendante de celle de la biomasse cible [128]. Cependant, l'acquisition des données de séquences est toutefois nécessaire et devra se faire à partir du séquençage de l'ADN extrait de cellules prélevées dans leur environnement naturel avec les risques de contamination que cela comporte [129,130].

De plus, une étape de perméabilisation des enveloppes cellulaires est systématiquement associée aux protocoles d'hybridation *in situ* pour permettre aux sondes de pénétrer dans la cellule. Ce traitement est généralement létal pour la cellule, la structure physique de la bactérie conservant cependant son intégrité, assurant ainsi la protection de l'ADN. Le niveau de spécificité peut être très élevé, l'hybridation *in situ* ayant montré dans certains exemples sa capacité à distinguer des séquences (donc des organismes) ne différant que d'un seul nucléotide dans la zone ciblée par la sonde [125]. Cependant, les conditions physico-chimiques d'hybridation peuvent être modulées vers une drastité (stringence en anglais) moindre permettant une détection moins restrictive.

Au cours de ces vingt dernières années l'hybridation moléculaire appliquée au marquage des bactéries s'est déclinée sous de nombreuses formes techniques [127]. Le principe de base reste identique, que l'hybridation soit réalisée sur un support solide (filtre ou lame de verre) ou sur des bactéries en immersion dans un tampon d'hybridation. La procédure de marquage comprend : une première étape de fixation (perméabilisation) des cellules suivie d'une étape de préparation de l'échantillon (ex : dépôt sur un filtre) et de l'hybridation elle-même par mise en présence des sondes avec l'échantillon; une étape finale de lavage permet de retirer les sondes en excès avant l'observation des résultats de l'hybridation (cf. figure 5).

Fluorescent in situ Hybridization



Source : <http://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish>

Figure 5 : Principe général de l'hybridation in situ appliquée à des bactéries ; exemple de sondes fluorescentes complémentaires de régions du gène 16S.

A partir d'un échantillon environnemental complexe, les bactéries sont perméabilisées afin de permettre aux sondes de pénétrer dans les cellules pour aller s'hybrider au niveau des ARNr 16S présents au sein des ribosomes. Après marquage le mélange de cellules est analysé à l'aide d'appareils adaptés.

D. Production de molécules fluorescentes

Il existe aujourd'hui des protéines possédant la propriété d'émettre de la fluorescence [131], par exemple la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) qui est la plus couramment utilisée, comme son nom l'indique, une fluorescence verte. Cette protéine, initialement identifiée chez une méduse *Aequorea victoria* existe aussi sous d'autres variantes obtenues par ingénierie génétique (egfp, cfp, ...). Il faut également noter qu'il existe aussi d'autres protéines fluorescentes qui ont été isolées dans la nature comme par exemple la DsRed isolée à partir d'un corail, mais la plus couramment utilisée reste la gfp.

Le fort intérêt de cette protéine repose sur sa capacité à être fusionnée par remodelage de son gène à un gène fonctionnel permettant ainsi lors de la synthèse protéique de non plus produire la

protéine étudiée mais une version hybride et fluorescente. Ce système permet de disposer d'un outil de localisation et de quantification de l'expression de ce gène d'intérêt permettant d'étudier par exemple des processus de type régulation génétique [132]. En écologie microbienne le marquage spécifique d'un isolat peut ainsi obtenu par insertion du gène *gfp* dans son génome permettant de suivre visuellement le développement et la colonisation du milieu par la souche bactérienne ainsi marquée [133,134]. L'utilisation de ce type de marqueur peut aussi servir à étudier *in situ* les événements de transfert horizontal de gènes entre bactéries [135].

E. Ciblage de bactéries actives à l'aide de nanoparticules magnétiques

Une autre approche de marquage de bactéries a été proposée par Zhang et collaborateurs [136,137] en utilisant des particules magnétiques afin de récupérer à partir de boues de station d'épuration une fraction enrichie en bactéries impliquées dans la dégradation de phénols. La méthode développée permet de fonctionnaliser les cellules bactériennes avec des nanoparticules magnétiques de manière extrêmement efficace (>99 % [137]) en présentant l'avantage d'être biocompatible, les cellules restant viables après marquage. Zhang et collaborateurs ont utilisé du poly(allylamine hydrochloride) ou PAAH un polymère chargé positivement, non toxique et biocompatible possédant la propriété de s'attacher fortement aux cellules [138]. Le protocole d'enrichissement, comme l'illustre la figure 6, consiste en une première étape de fonctionnalisation des cellules avec les nanoparticules magnétiques (18 nm) avant la seconde étape de multiplication *in vitro*. Ainsi les bactéries qui vont se multiplier vont progressivement perdre au cours du processus de division cellulaire leurs nanoparticules. Par attraction magnétique les cellules qui ne se sont pas multipliées vont être éliminées de la suspension pour n'y laisser que les bactéries vivantes et actives.

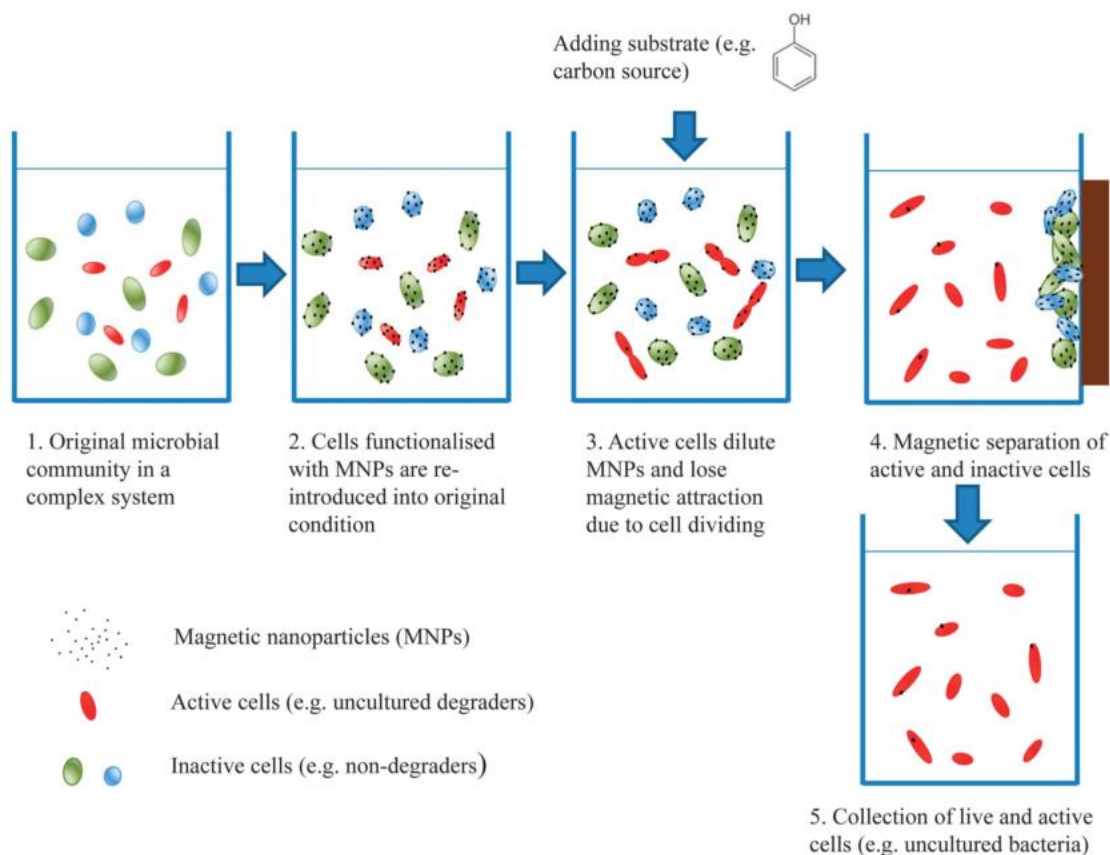


Figure 6 : Représentation schématique du processus de récupération de bactéries vivantes et actives par fonctionnalisation de surface avec des nanoparticules magnétiques et mise en culture. D'après [136].

Les cellules bactériennes issues d'un échantillon environnemental sont toutes fonctionnalisées avec des particules magnétiques (2). Lors de la mise en culture, les bactéries aptes à se multiplier créeront de nouvelles générations de bactéries qui perdront petit à petit leur charge magnétique (3) permettant d'exclure uniquement les bactéries non actives par attraction magnétique (4).

IV. **Les différentes stratégies d'hybridation *in situ* :**

En raison de sa capacité à cibler spécifiquement des portions précises des génomes, l'hybridation *in situ* est aujourd'hui la méthode la plus adaptée pour le marquage des bactéries issues d'un échantillon complexe. De nombreuses variantes ont été développées avec la volonté d'accroître la sensibilité du marquage avec des niveaux de spécificité variant du règne à l'espèce.

A. Structure générale des sondes

La sélection de la sonde est une étape critique lors de la préparation d'une expérience d'hybridation *in situ*, son « design » doit prendre en compte des aspects de spécificité et de sensibilité ainsi que la notion de pénétration dans les cellules. Les sondes oligonucléotidiques sont constituées d'un fragment d'ADN simple brin synthétique d'une longueur comprise entre 15 et 20 bases (taille optimale pour assurer à la réaction d'hybridation le plus fort niveau de spécificité) [139]. Peuvent également être utilisées des sondes polynucléotidiques d'une taille supérieure à 100 bases.

Avec la séquence la taille des sondes est un critère important à considérer car elle conditionne le niveau de spécificité de l'hybridation [140,141]. A partir d'une certaine longueur (aux alentours de 20 bases) le niveau de spécificité va diminuer avec la taille. En effet, le duplex formé sera d'autant plus difficile à déstabiliser en présence de mésappariements que le fragment concerné sera long [142,143]. Le problème sera d'autant plus critique que l'objectif visera à discriminer entre segments d'ADN ne présentant que peu de variations dans leur séquence. C'est notamment le cas avec le gène 16S connu pour son niveau élevé de conservation chez les organismes, l'importance des différences de séquences entre 2 organismes témoignant de leur plus ou moins forte (ou faible) proximité phylétique [144,145]. Si l'objectif de l'expérimentation est de discriminer deux populations de bactéries phylogénétiquement proches, un fort niveau de spécificité de la réaction d'hybridation sera requis car le nombre de mésappariements entre les deux séquences du gène 16S sera très limité. Cependant, l'utilisation de sondes courtes assurant un niveau de spécificité élevé se fait au détriment de la sensibilité qui atteint un meilleur niveau avec les sondes longues [140]. Il sera montré plus loin que les conditions physico-chimiques de

l'hybridation avec des sondes polynucléotidiques peuvent être optimisées pour accroître le niveau de spécificité tout en maintenant la sensibilité à un niveau élevé.

La qualité de l'hybridation dépend d'abord de la séquence des sondes, elle-même conditionnée par la position du fragment d'ADN visé sur le génome du microorganisme ciblé. Plusieurs programmes informatiques d'aide à la caractérisation de sondes ont été développés pour des régions d'ADN les plus couramment ciblées. Ainsi on peut citer Probe_Design, une extension du logiciel ARB [146], mathFISH [147], PRIMROSE [148] ou KASpoD . Ces programmes prennent en compte différents paramètres pour proposer des sondes adaptées à l'objectif recherché, incluant le niveau de conservation de séquences (zone conservée / zone variable). Ces programmes utilisent les bases de données existantes ou spécifiquement construites afin de comparer les séquences pour déterminer les positions adéquates en considérant également la longueur de la sonde et le taux de base G (guanine) et C (cytosine). Un expérimentateur peut aussi recourir aux bases de données existantes regroupant les différentes sondes déjà caractérisées et validées expérimentalement pour la plupart, notamment celles caractérisées pour cibler les régions plus ou moins variables des gènes des petites (16S) et grandes (23S) sous-unités de l'ARN ribosomique des bactéries (<http://probebase.csb.univie.ac.at/node/8>) [149,150]. Ces programmes sont principalement réservés à la caractérisation de sondes de petite taille mais d'autres, plus récents, concernent le « design » de sondes de type polynucléotidique [141].

Les sondes peuvent aussi être adaptées chimiquement afin d'accroître la stabilité des duplex en cas d'appariement total tout en fragilisant ceux comportant des mésappariements [151]. C'est ainsi le cas avec les LNA (Lock Nucleic Acid) qui possèdent des bases dont la structure chimique est légèrement différente de celle constituant les acides nucléiques naturels (ADN et ARN). Les LNA ou sondes LNA sont des oligonucléotides comprenant au minimum une base modifiée. Par rapport aux bases classiques, ces bases LNA possèdent en plus un pont méthylène (-CH₂-) entre l'hydroxyle en position 2 et l'atome de carbone 4 du sucre (cf. figure 7). Ces bases modifiées sont intégrées dans les sondes permettant à celles-ci d'afficher des caractéristiques en termes de stabilité totalement différentes [152]. En effet, les LNA forment avec leur complémentaire ADN ou ARN des complexes extrêmement stables thermiquement, justifiant d'éviter toute possibilité d'hybridation aspécifique des LNA dont les liaisons extrêmement fortes sont difficiles à rompre (voir le site : <https://www.exiqon.com/oligo-tools>). A l'image des sondes ADN et ARN

classiques, la stabilité des duplex incluant des LNA dépendra de la taille de la sonde et du nombre de LNA inclus. Les LNA ont démontré leur intérêt face à leurs homologues classiques pour la détection de séquences d'intérêt chez les microorganismes grâce à l'obtention d'un signal de fluorescence bien supérieur dans le cas de sondes LNA qui est même parfois inexistant lors de l'utilisation d'une sonde classique [151].

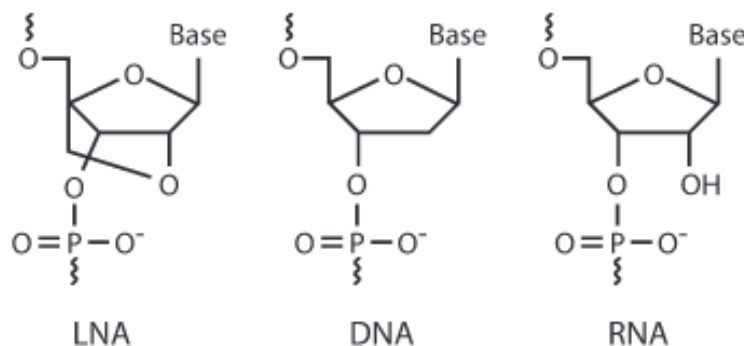


Figure 7 : Structure des LNA par rapport aux ADN et ARN.

Le LNA intègre dans sa structure un pont méthylène (-CH₂-) le groupement hydroxyle en position 2 et l'atome de Carbone en position 4 de l'acide nucléique.

B. Les cibles des sondes

L'hybridation *in situ* permet de cibler des portions précises du génome d'une bactérie. Ces portions du génome peuvent être soit en lien avec la taxonomie de l'organisme, soit avec une de ses fonctions (un gène).

Pour l'analyse taxonomique, les gènes ARN ribosomique 16S et 23S sont les marqueurs les plus souvent ciblés [153,154]. Ubiquistes, ces ARNr ont un rôle fondamental dans le fonctionnement de la cellule bactérienne, prenant part à la structuration des ribosomes impliqués dans les processus de traduction des ARN messagers (ARNm). La structure des gènes 16S et 23S présente une alternance de régions dont la séquence est de totalement à très fortement conservée entre tous les organismes et de domaines pour lesquels la séquence entre organismes va être plus variable [155]. Les parties conservées vont être utilisées pour la caractérisation de sondes dites

universelles ou spécifiques des domaines les plus élevés dans l'arbre du vivant comme la sonde Eub338 dont la séquence permet le marquage de la plupart des bactéries [156]. Cette forte conservation des séquences même chez des microorganismes phylétiquement très éloignés est due à la très forte contrainte fonctionnelle des domaines concernés au sein desquels toute mutation sera létale. D'autres régions correspondent à des domaines moins contraints structurellement qui permettent l'accumulation progressive de mutations ponctuelles [157]. Suivant les dates de divergence à partir de l'ancêtre commun, les mutations accumulées dans ces régions variables des gènes 16S et 23S permettront la caractérisation de sondes dont le niveau de spécificité pourra aller jusqu'au genre, parfois jusqu'à l'espèce [158–160]. L'utilisation du gène 16S permet donc une caractérisation taxonomique basée sur la phylogénie et ses parties variables la délimitation de sondes nucléiques dont le niveau de spécificité variera suivant la région étudiée du niveau taxonomique le plus strict (espèce) à tous les intermédiaires jusqu'à la sonde universelle. L'ARNr 16S est aujourd'hui une cible très appréciée pour l'hybridation *in situ*, car en plus des atouts liés à la spécificité, le nombre potentiellement élevé de copies dans une cellule confère un niveau de sensibilité plus élevé que des sondes qui cibleraient d'autres régions du génome, où le nombre de copies demeurera limité [74,127]. Avec le développement du séquençage à haut débit, les analyses de diversité microbienne ont connu un important essor avec l'amplification PCR des régions variables suivie de leur séquençage aboutissant à une accumulation extrêmement importante de séquences dans les bases de données telles que RDP [161] (Ribosomal Database Project). Y sont également répertoriées des séquences de microorganismes non cultivés du fait de la possibilité d'amplifier l'ADN bactérien directement extrait de l'environnement. Ce très grand nombre de séquences disponibles du gène 16S favorise ainsi la caractérisation de sondes dont le niveau de spécificité peut être évalué *in silico* avant confirmation expérimentale. Quoique moins fournies, les bases de données de séquences du gène 23S existent néanmoins et leur exploitation permet également de proposer des sondes, notamment dans le domaine III qui est une région hypervariable permettant la reconnaissance spécifique de l'embranchement des bactéries [142,162]. Ce point sera repris plus en détail dans le prochain chapitre.

Complétant l'hybridation à objectif taxonomique, le choix de gènes fonctionnels permet à l'hybridation moléculaire d'aborder les potentialités fonctionnelles contenues dans les génomes d'un microbiote au sein d'un écosystème [163–166]. Les fonctions les plus généralement ciblées

sont celles correspondant à des enzymes impliquées dans des voies métaboliques (biodégradation de polluants par exemple) ou dans un processus de production d'une molécule d'intérêt (antibiotique par exemple). Du fait de la redondance fonctionnelle détectée dans la majorité des écosystèmes, l'hybridation détectera des gènes pouvant appartenir au génome de bactéries phylogénétiquement très éloignées. Comme nombre de ces fonctions interviennent généralement dans le potentiel adaptatif des bactéries (*fitness*) la localisation de leurs gènes est régulièrement plasmidique. Le fait que le nombre de copies des plasmides par cellule peut être élevé contribue à rendre plus sensible l'hybridation ciblant de tels gènes par rapport à ceux dont la localisation est chromosomique. Nombre de ces gènes fonctionnels ne possèdent cependant pas les caractéristiques des gènes 16S et 23S structurés en zones conservées et variables. La contrainte fonctionnelle n'a pas non plus été toujours suffisamment forte pour maintenir des régions d'ADN au sein desquelles le nombre de mutations ponctuelles est resté suffisamment bas pour être compatible avec la création de sondes ciblant un nombre significatif d'allèles. Enfin, les bases de données de séquences pour les gènes fonctionnels sont beaucoup moins fournies que celles des gènes 16S et 23S justifiant la combinaison des approches *in silico* et expérimentales pour déterminer quel niveau de spécificité peuvent atteindre ces sondes fonctionnelles. D'un point de vue plus conceptuel, il est important de rappeler le rôle du transfert horizontal de gènes dans l'évolution des génomes bactériens et donc la possibilité que ces fonctions adaptatives puissent être transférées entre bactéries. Les approches d'hybridation moléculaire couplées aux autres outils comme la métagénomique et le séquençage sont des atouts inestimables pour adresser ces questions d'importance et notamment pour établir les liens existant entre structures et fonctions au niveau d'une communauté bactérienne [167,168].

C. Hybridation *in situ* et fluorescence : le FISH

LE FISH introduit en 1988 pour les bactéries est aujourd'hui une méthode classiquement utilisée en écologie microbienne et reste toujours d'actualité malgré la forte tendance au séquençage massif de génomes et de metagénomes dans un contexte d'écologie microbienne. Il existe aujourd'hui de nombreux procédés pour marquer par fluorescence des bactéries suite à l'hybridation *in situ*, grâce à des protocoles de marquage de plus en plus sophistiqués qui ont permis d'en améliorer les propriétés en termes de sensibilité et spécificité. Les applications concernent autant l'identification d'une séquence d'intérêt dans un échantillon pour en déterminer qualitativement et quantitativement un organisme ou un gène que l'extraction des cellules identifiées par hybridation du reste du microbiote, à l'aide d'un trieur de cellules approprié [160,169,170].

Quand ont été déterminés le type de sondes à utiliser, oligonucléotidiques ou polynucléotidiques, leur longueur et leur séquence, se pose la question du marquage de façon à pouvoir identifier les duplex formés. Nous n'évoquerons ici que le recours à des systèmes non radioactifs même si les sondes chaudes ont été largement utilisées dans le passé pour de très nombreuses applications du fait notamment de leur grande sensibilité.

La méthode la plus simple de marquage d'une sonde consiste à y fixer directement un marqueur fluorescent. Cette méthode est aussi la plus communément utilisée car peu onéreuse, simple d'utilisation et ne nécessitant pas d'étape post-hybridation pour révéler le marquage. Le marqueur fluorescent est généralement ajouté à l'une des extrémités de la sonde oligonucléotidique lors de l'étape de synthèse. En revanche, pour les sondes longues qui incorporent plusieurs marqueurs fluorescents ces derniers seront ajoutés pendant la synthèse [142,170–172].

D'autres approches incluent le greffage sur la sonde de molécules dites rapporteuses telles que la digoxygénine ou la biotine avant révélation des duplex formés lors de l'hybridation par ajout d'un anticorps spécifique de la digoxygénine [173] ou d'une streptavidine couplée à un fluorophore. Ce marquage indirect améliore la sensibilité de l'hybridation et peut même se concevoir avec le marquage de la sonde par plus d'un fluorophore pour accroître les applications de l'hybridation [174].

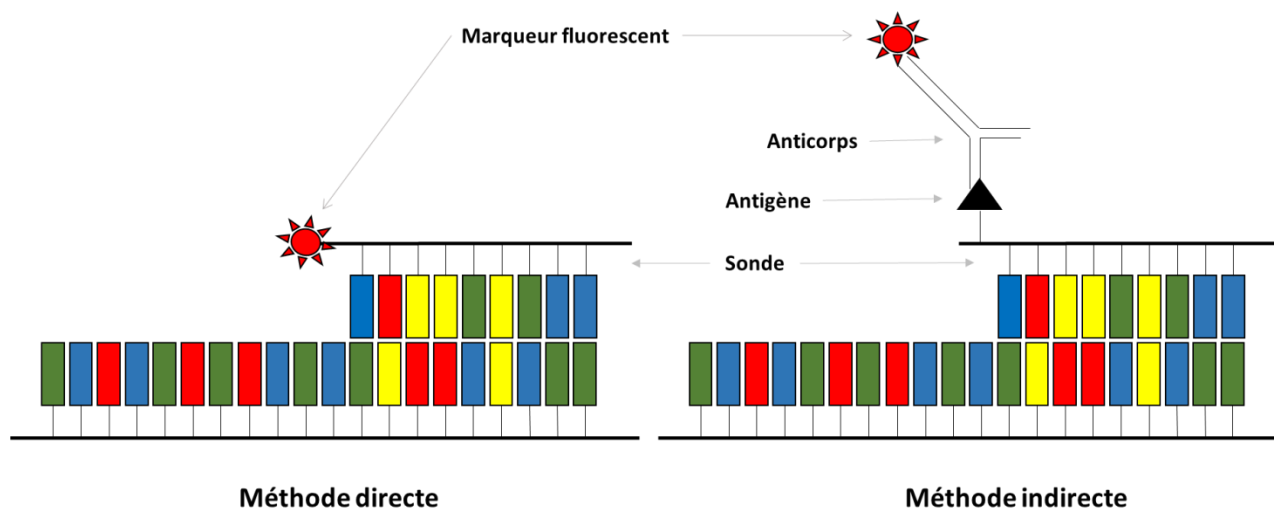


Figure 8 : Représentation schématique du marquage fluorescent direct et indirect.

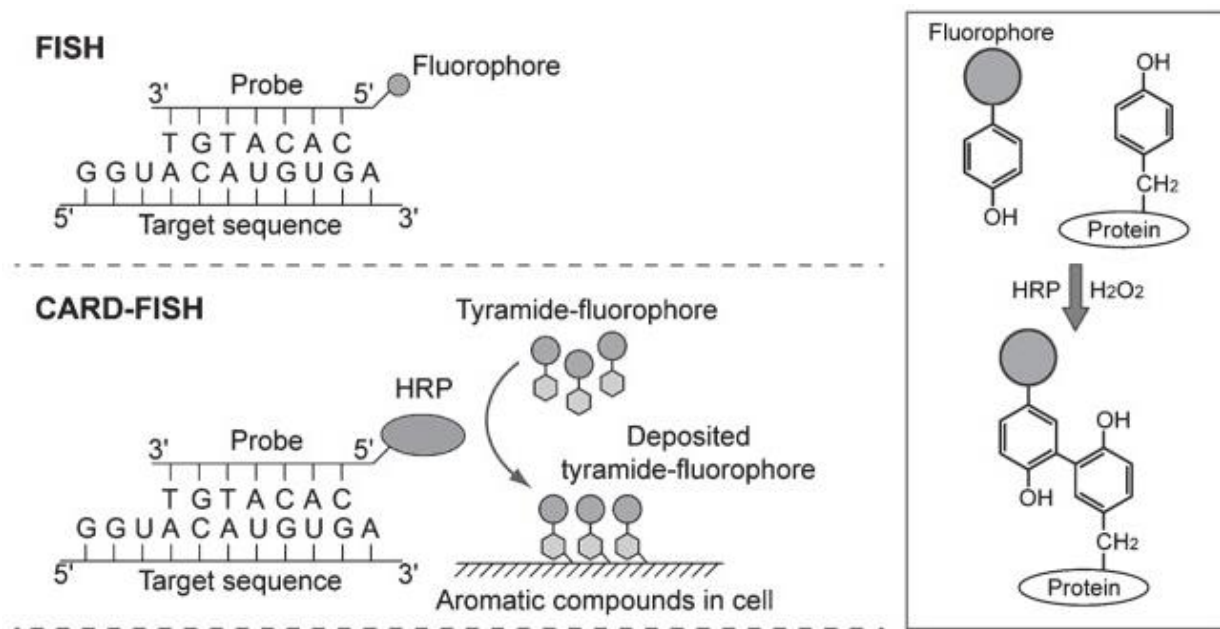
Lors d'un marquage direct, les sondes sont directement liées au marqueur (ici fluorescent) contrairement à une méthode indirecte où la sonde sera fonctionnalisée avec un antigène (par exemple) qui sera lui-même reconnu par un anticorps spécifique marqué.

Cependant, le manque de sensibilité de la méthode FISH demeure problématique notamment quand sont ciblés des gènes ou des transcrits présents en faible nombre de copies. Le nombre de fluorophores fixés aux sondes oligonucléotidiques est contraint par leur positionnement limité aux extrémités et toute tentative pour obtenir un gain de sensibilité ne doit pas se faire au détriment de la spécificité comme cela a pu être rapporté à quelques reprises dans la littérature [174,175]. Cette approche avec un double marquage de la sonde peut se combiner avec le recours à plusieurs de ces sondes complémentaires de régions d'ADN différentes, soit de la même cible pour accroître la sensibilité, soit de cibles différentes comme le propose la technique CLASI-FISH [158] capable de détecter simultanément 15 espèces bactériennes au détriment toutefois de la sensibilité globale.

Le remplacement des fluorophores par des *quantum dots* constitués de nanoparticules dotées d'un noyau fluorescent arborant différentes fluorescences en fonction de leur taille [176] peut également significativement augmenter le signal de fluorescence.

La technique CARD-FISH [177] (Catalysed Reporter Deposition-FISH) ou TSA-FISH [166] développée pour répondre aux problèmes de sensibilité est basée sur une amplification du signal fluorescent par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique due à une peroxydase (HRP) portée

par la sonde activant des fluorophores initialement inactifs, couplés à des tyramines intégrées dans les cellules. L'accumulation de molécules fluorescentes dans la cellule dont l'hybridation a généré des duplex produit un signal bien supérieur à ce qui peut être observé par les méthodes classiques (cf. figure 9).



D'après [178]

Figure 9 : Représentation schématique du marquage FISH et CARD-FISH.

Les techniques RCA-FISH [165] (pour *Rolling Circle Amplification*) et HCR [179] pour (*Hybridization Chain Reaction*) ont également été développées pour accroître le signal de fluorescence après génération de duplex par hybridation. Le RCA-FISH utilise les propriétés d'une ADN polymérase $\phi 29$ [180] qui après hybridation de la sonde appelée *padlock*, réalisera une réaction d'amplification basée sur la région non appariée de la sonde comme matrice générant une longue queue d'acides nucléiques simple brin sur lesquels viendront s'hybrider, dans une seconde étape, des oligonucléotides marqués avec les fluorophores (cf. Figure 10). La HCR est basé sur un procédé plus simple ne nécessitant aucune réaction enzymatique mais uniquement des réactions d'hybridation avec un premier type de sondes dites initiatrices et deux types de sondes dites amplificatrices [179,181]. La structure de la sonde initiatrice lui permet d'arborer une partie libre après hybridation sur sa cible, cette partie libre servant à la fixation par

chevauchement en chaîne des deux sondes amplificatrices. Le mécanisme de fonctionnement de cette approche sera détaillé davantage dans le prochain chapitre.

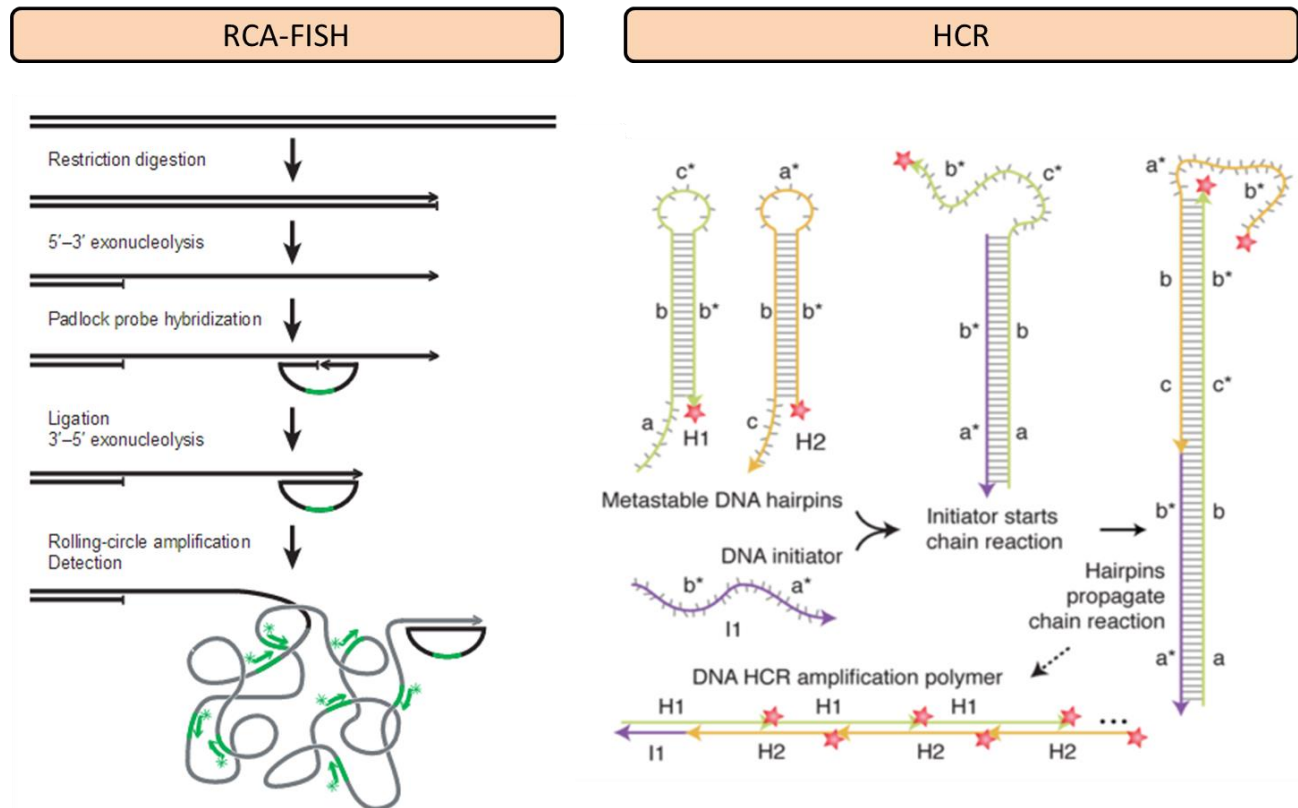


Figure 10 : Schéma du fonctionnement des techniques RCA-FISH [165] et HCR [179] pour la formation d'une structure d'acides nucléiques pour l'amplification du signal après hybridation.

RCA-FISH et HCR sont deux techniques permettant la formation d'une structure secondaire constituée d'acides nucléiques qui sera porteuse des marqueurs nécessaire à la révélation de l'hybridation. Le RCA FISH est une technique de marquage en trois étapes faisant appel à une sonde circulaire simple brin appelée padlock. Dans un premier temps la sonde padlock sera hybridée avec sa cible, puis cette même sonde servira de matrice pour la synthèse d'un long brin d'ADN. Une seconde sonde, couplé à un fluorophore et complémentaire du brin synthétisé servira à révéler l'hybridation initiale. La HCR est basée sur l'utilisation d'une sonde possédant en surplus une partie appelé initiateur qui restera libre lors de l'hybridation. Sur cet initiateur deux autres sondes marquées viendront s'hybrider chacune leur tour afin de former un long brin d'ADN double brin marqué.

Les problèmes de sensibilité sont beaucoup moins aigus lorsque sont utilisées des sondes polynucléotidiques, leur structure et leur taille plus élevée leur permettant le greffage direct ou indirect d'un nombre beaucoup plus important de marqueurs contribuant à une augmentation significative de l'intensité des signaux d'hybridation, que ce soit sur des cibles à vocation taxonomique [140,142,182] ou fonctionnelle [164]. Nous avons cependant vu préalablement que

les hybridations utilisant ce type de sondes présentent un niveau de spécificité généralement moindre que les sondes oligonucléotidiques.

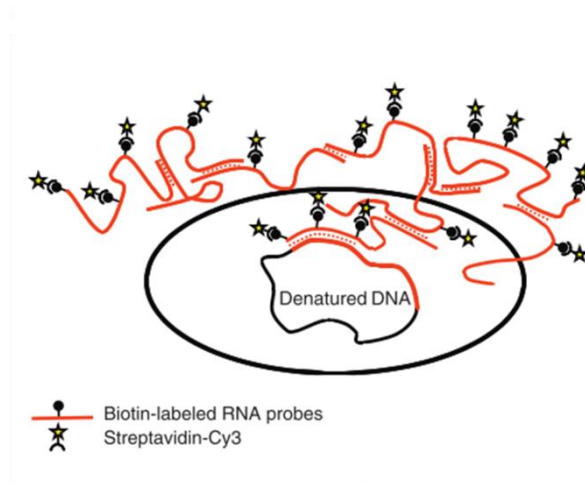
D. Hybridation *in situ* et magnétisme : le MISH

Un marquage magnétique (plutôt qu'en fluorescence) des sondes est généralement effectué en vue de l'exploitation des forces magnétiques pour séparer les cellules hybridées du reste du microbiote. Cette approche de « *probe-based cell fishing* » [170] proposée par Stoffels et collaborateurs est relativement récente (début des années 2000), et a été peu étudiée jusqu'à ce jour.

Les particules magnétiques même de taille nanométriques, sont encore trop volumineuses pour traverser facilement la paroi et la membrane de la cellule bactérienne, y compris après traitement de perméabilisation appliqué aux cellules fixées. Cette difficulté de pénétration des particules constitue l'un des principaux points de blocage du développement de l'hybridation *in situ* basée sur un marquage magnétique des cellules bactériennes (voir chapitre 2).

A notre connaissance, le seul exemple répertorié dans la littérature du développement de cette approche découle de l'observation d'un halo fluorescent autour de cellules bactériennes quand celles-ci avaient été hybridées à l'aide de sondes polyribonucléotidiques fluorescentes de structure particulière [142] qui lui donnera plus tard le nom de *RING-FISH* [164] (cf. figure 11). Si la partie de la sonde complémentaire des séquences de la cible avait bien produit le duplex attendu à l'intérieur de la cellule, seule l'hypothèse de la présence de l'autre extrémité à l'extérieur de la cellule était en mesure d'expliquer la présence du halo. Ces propriétés de segments d'ADN traversant de part en part les enveloppes de la cellule ont été exploitées par Zwirgmaier et collaborateurs pour développer le concept de *network hypothesis* [183] qui ne sera cependant pas appliqué pour la capture magnétique mais à une capture par hybridation à l'image des puces à ADN en 2004 dans leur papier intitulé « *probe based cell sorting* » (hybridation sur une surface fonctionnalisée avec des sondes utilisant les extrémités demeurant à l'extérieur pour y réaliser des réactions d'hybridation et donc de fixation sur le support) [184].

Pour leurs travaux, Stoffels et collaborateurs ont utilisé des sondes complémentaires de régions du domaine III de l'ARNr 23S obtenues par transcription *in vitro*. Ces sondes ont incorporé lors de leur synthèse des uraciles couplés à une biotine pour, dans une dernière étape après hybridation, être marquées par des particules magnétiques fonctionnalisées avec de la streptavidine. Les premières tentatives de séparation de bactéries ont montré l'intérêt de l'approche puisque la suspension bactérienne récupérée à partir d'un mélange complexe comportant jusqu'à un taux de 90 % de les cellules ciblées par la sonde [170].



D'après [127]

Figure 11 : Principe du marquage avec des sondes polyribonucléotidiques selon l'hypothèse de la formation d'un réseau de sondes extracellulaires.

Les sondes, lors de l'hybridation forment un réseau complexe passant au travers des enveloppes (membrane et paroi) bactériennes permettant aux biotines des sondes d'être accessibles dans le milieu extracellulaire.

Une première application de cette approche fut réalisée par Pratscher et collaborateurs [163] pour extraire d'échantillons de sol les bactéries impliquées dans le processus de dénitrification qui implique la transformation des nitrites en oxyde nitreux médiée par les produits du gène *nirk*. Elle a également été reprise par Jérémy Pivetal [172,185,186] dans le cadre de ses travaux de thèse au sein du laboratoire Ampère pour le marquage magnétique de bactéries.

Une approche alternative, Magneto-FISH repose sur l'utilisation couplée du CARD-FISH et d'un immunomarquage. Après application de la technologie CARD-FISH décrite précédemment induisant l'accumulation de fluorophores au niveau de la cellule, un anticorps porteur d'une

particule magnétique est ajouté au mélange afin de greffer sur la bactérie les particules magnétiques. Cette approche développée par Pernthaler et collaborateurs [187] puis optimisée ultérieurement [188] a été appliquée pour la caractérisation des archées environnementales.

V. Généralités sur le magnétisme

A. Les matériaux magnétiques

Les matériaux magnétiques pourront être classés en trois catégories : diamagnétiques, paramagnétiques ou ferromagnétiques (cf. figure 13), selon la valeur de leur susceptibilité magnétique, notée χ . L'interaction entre un matériau et un champ magnétique $\mathbf{H}$ est caractérisée par la relation :

$$\mathbf{M} = \chi \mathbf{H} \quad (\text{Eq.1})$$

Où $\mathbf{M}$ représente l'aimantation du matériau, c'est-à-dire la densité volumique de moment magnétique.

L'induction résultante dans le matériau s'exprime alors par :

$$\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M}) = \mu_0(1 + \chi)\mathbf{H} = \mu_0\mu_r\mathbf{H} = \mu\mathbf{H} \quad (\text{Eq.2})$$

μ désigne la perméabilité absolue du matériau et μ_r est sa perméabilité relative. μ_0 correspond à la perméabilité magnétique du vide et vaut $4\pi \times 10^{-7} \text{ T} \cdot \text{m/A}$

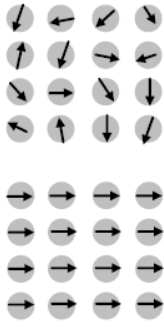
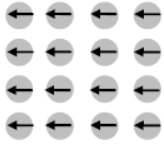
Les matériaux diamagnétiques sont des matériaux dont la susceptibilité magnétique est négative et proche de zéro (autour de -10^{-6} à -10^{-4}). Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur, ils répondent faiblement au champ d'excitation et s'aimantent dans la direction opposée au champ magnétique appliqué. Cette aimantation disparaît en l'absence de champ appliqué. On retrouve dans ce groupe la quasi-totalité de la matière biologique et organique ainsi que certains métaux (exemples : eau, alcool, Cuivre, Zinc, Or...).

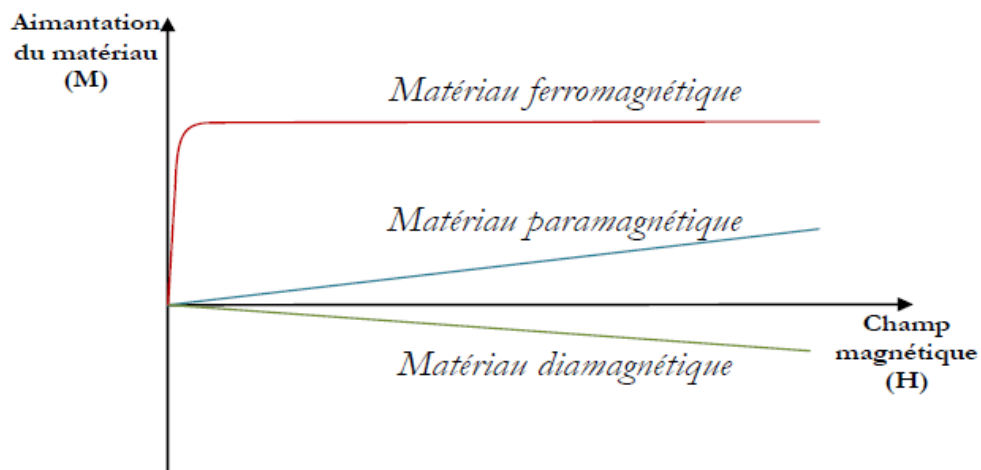
De la même manière, les matériaux paramagnétiques ne possèdent pas d'aimantation spontanée. Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, ils acquièrent une aimantation dirigée dans le

même sens que ce champ d'excitation et proportionnelle à ce dernier. Leur susceptibilité magnétique est faible (typiquement comprise entre 10^{-5} et 10^{-3}) mais toujours positive, et elle diminue avec la température. On retrouve par exemple dans cette catégorie l'oxygène, le sodium, le magnésium, l'aluminium, le potassium et le platine.

Enfin, les matériaux ferromagnétiques constituent la catégorie de matériaux présentant la plus forte capacité d'aimantation. Sous l'effet d'un champ magnétique externe, les matériaux ferromagnétiques s'aimantent dans le même sens que ce dernier. Si l'on accroît l'intensité du champ magnétique, l'aimantation augmente rapidement jusqu'à atteindre une valeur maximale, correspondant à la saturation. Si l'on fait ensuite décroître le champ d'excitation H jusqu'à complète annulation, on constate qu'il subsiste une aimantation M_r , dite « aimantation rémanente ». Le cycle d'hystérésis de la figure 13 montre que l'aimantation d'un matériau ferromagnétique dépend non seulement de l'intensité du champ appliqué, mais également de l'aimantation antérieure. Pour être en mesure d'annuler l'aimantation, il faut inverser le champ d'excitation jusqu'à une valeur $-H_c$ représentant le « champ coercitif ». On distingue les matériaux ferromagnétiques doux et durs, respectivement caractérisés par des cycles d'hystérésis étroit et large. Les matériaux doux possédant une aimantation rémanente et un champ coercitif faibles sont utilisés par exemple pour la fabrication d'électro-aimants de façon à pouvoir éliminer rapidement l'aimantation à la coupure du courant alors que les matériaux durs présentant des valeurs élevées de M_r et H_c sont bien adaptés à la fabrication d'aimants permanents.

Le superparamagnétisme traduit le comportement des matériaux ferromagnétiques lorsque ceux-ci se présentent sous la forme de petits grains ou nanoparticules, c'est à dire lorsqu'ils sont réduits à un unique domaine magnétique. En l'absence de champ magnétique appliqué, leur aimantation apparaît nulle. Les matériaux superparamagnétiques ont une susceptibilité très supérieure à celle des matériaux paramagnétiques standards ($\chi \approx 1$).

Les groupes magnétiques	Susceptibilité magnétique relative	Comportement Atomique / magnétique	
Diamagnétique	Petite ($\chi_r \ll 1$) Négative (répulsion)	Sous l'action d'un champ magnétique : les moments magnétiques sont nuls et la réponse très faible.	
Paramagnétique	Petite ($\chi_r \ll 1$) Positive (attraction)	Sans champ magnétique : orientation aléatoire des moments magnétiques (pas d'interaction entre voisins atomiques). Sous l'action d'un champ magnétique : orientation parallèle des moments magnétiques.	
Ferromagnétique	Grande ($\chi_r \gg 1$) Positive (attraction) Fonction du champ appliqué.	Sous l'action d'un champ magnétique : orientation parallèle et dans le même sens des moments magnétiques au champ extérieur	



D'après Fulcrand, 2009

Figure 12 : Comportement de différents matériaux magnétiques sous l'effet d'un champ magnétique et courbes d'aimantation de ces matériaux.

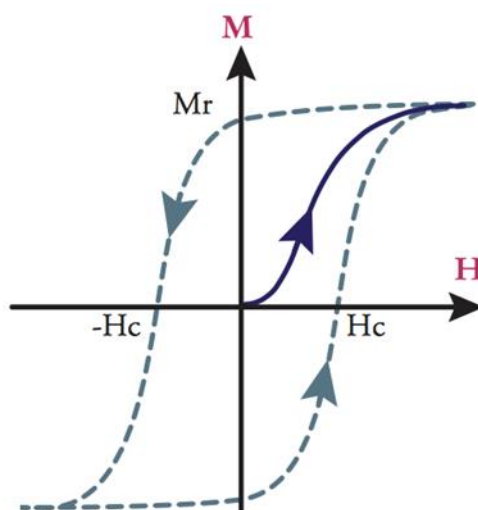


Figure 13: Courbe de première aimantation et Cycle d'hystérésis pour des matériaux ferromagnétiques décrivant le comportement d'un matériau ferromagnétique sous l'effet d'un champ d'excitation H .

B. Les particules magnétiques

Les particules les plus souvent utilisées pour réaliser un marquage magnétique des bactéries sont des billes paramagnétiques ou superparamagnétiques. Elles sont généralement constituées d'un cœur comprenant un ou plusieurs grains d'oxyde de fer (magnétite Fe_3O_4 ou maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), recouvert d'une coquille de silice ou de polymère sur laquelle seront greffées des molécules fonctionnelles. Ces dernières serviront de lien entre les cellules à marquer et la particule elle-même (ex : anticorps, streptavidine, biotine,...) et doivent également permettre d'obtenir des particules monodisperses et des suspensions colloïdales stables dans le temps.

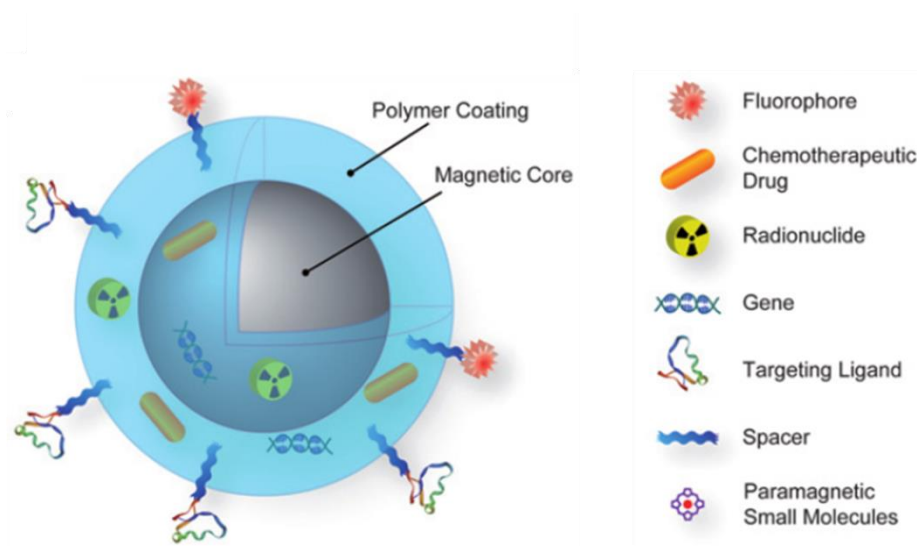


Figure 14 : Structure générale d'une particule magnétique composée d'un cœur magnétique recouvert d'une couche de polymère permettant la fonctionnalisation de la particule. d'après [189].

On trouve dans la littérature de nombreuses méthodes de synthèse, physico-chimiques [190] ou biologiques [191] et ces particules magnétiques sont aujourd'hui disponibles dans le commerce (DynaLab, Micromod, BangsLabs, Polysciences..) dans une très large gamme de tailles allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres. A noter que les microparticules sont généralement constituées d'une coque renfermant plusieurs inclusions superparamagnétiques nanométriques. Ce sont généralement des particules de taille nanométrique qui sont utilisées pour le marquage des bactéries de longueur caractéristique $1\text{ }\mu\text{m}$, afin d'éviter un encombrement trop important de la surface.

C. Les forces d'attraction magnétique

La force F_m s'exerçant sur une particule diamagnétique ou paramagnétique placée dans un champ magnétique dépend du volume de son cœur magnétique (V_p), de la différence de susceptibilité magnétique $\Delta\chi$ entre la particule (χ_p) et son milieu d'immersion (χ_m), ainsi que du gradient du champ magnétique appliqué. Il en découle la relation suivante :

$$\mathbf{F} = \frac{V_p \cdot \Delta\chi}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (\text{Eq.3})$$

Où V_p désigne le volume du cœur magnétique, M l'aimantation de la particule et $\mathbf{B}$ l'induction magnétique. ∇ représente l'opérateur gradient.

Dans le cas de particules superparamagnétiques, la saturation est cependant atteinte pour de faibles valeurs du champ appliqué. A titre d'exemple, cette valeur est de 0.02 T environ pour les Microbeads MACS de taille 50 nm [192] .

Dans ce cas la force magnétique s'exprime alors par :

$$\mathbf{F}_m = V_p M_{sat} (\mathbf{e}_B \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (\text{Eq.4})$$

$\mathbf{e}_B$ étant un vecteur unitaire orienté suivant la direction du champ magnétique.

Cette force dirige les particules superparamagnétiques dans le sens du gradient de champ, c'est à dire vers les zones d'intensité de champ maximale.

Le choix de travailler avec des particules magnétiques nanométriques impose certaines contraintes au niveau de la conception des sources de champ. Comme indiqué par l'équation 4, la force magnétique est proportionnelle au volume de la particule et diminue donc rapidement avec leur diamètre. Une solution pour pallier ce problème consiste à utiliser des sources magnétiques miniaturisées permettant d'augmenter le gradient de champ magnétique (cf. figure 15). En effet, lors de la réduction de la taille d'un aimant d'un facteur x , l'intensité du champ normalisée par rapport à la taille de l'aimant reste inchangée, tandis que le gradient augmente de ce même facteur x .

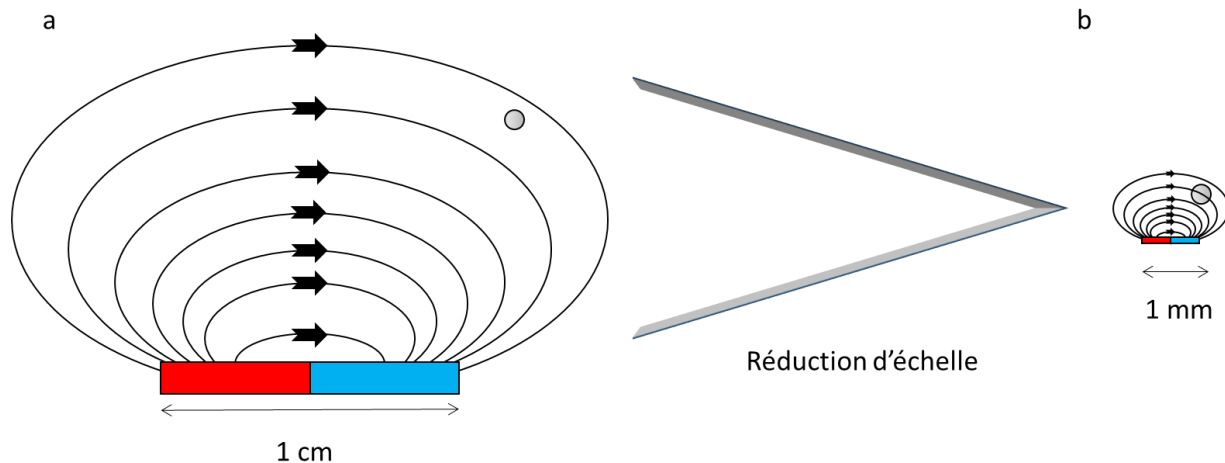


Figure 15 : Illustration de l'effet de la miniaturisation de la source de champ.

Cas a : la particule ne « perçoit pas » la non uniformité du champ. Cas b : le gradient est suffisamment important pour permettre le déplacement de la particule

VI. Les outils de tri cellulaire

Une fois les cellules d'intérêt marquées/fonctionnalisées avec les marqueurs adéquats au sein d'un mélange complexe, l'étape suivante dans le processus de tri cellulaire consistera à séparer physiquement les entités marquées du reste de l'échantillon. Compte tenu des deux grands types de marquage utilisés pour les bactéries on peut regrouper les trieurs en deux grandes catégories : ceux reconnaissant les signaux fluorescents et ceux séparant les objets d'après leurs propriétés magnétiques. Nous présenterons dans un premier temps les principes des trieurs macroscopiques pour ensuite faire une ouverture vers les microsystèmes, un type d'outils en plein essor. Après un bilan des avantages et inconvénients de ces différents outils, nous introduirons le dispositif de tri mis au point au laboratoire en collaboration avec l'institut Néel de Grenoble lors de précédents travaux.

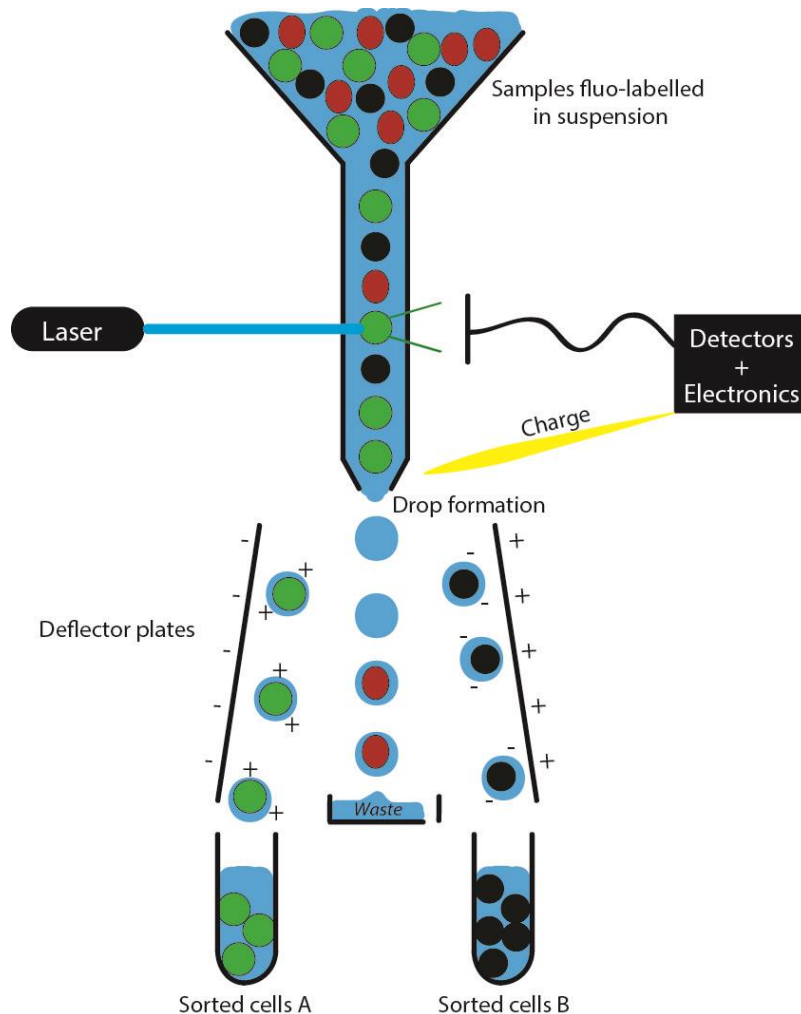
A. Les trieurs de cellules macroscopiques basés sur la fluorescence

1) La cytométrie en flux ou FACS®

Le cytomètre en flux est l'outil le plus souvent utilisé pour réaliser le tri de cellules marquées par fluorescence. Cet équipement permet de réaliser une analyse en série de signaux optiques et physiques émis par une cellule lorsqu'elle coupe le faisceau lumineux d'un laser. L'analyse implique la mise en suspension de l'échantillon dans un flux hydraulique d'un diamètre de l'ordre de quelques micromètres lui-même entouré d'un second flux hydraulique permettant de diriger le flux primaire contenant l'échantillon vers la fenêtre de détection. La structure de cette voie d'acheminement est telle que les bactéries sont positionnées à la suite les unes des autres dans le flux hydraulique permettant de réaliser l'analyse par le laser de chaque cellule individualisée de l'échantillon. Au niveau de la fenêtre de mesure, les paramètres de déviation de ce faisceau ainsi que les signaux de fluorescence détectés seront enregistrés. Ces paramètres permettent d'obtenir des informations sur les caractéristiques physiques des cellules analysées telles que leur taille et leur intensité de fluorescence.

Certains cytomètres en flux sont équipés d'un module permettant le tri des cellules, justifiant la dénomination anglaise de *Fluorescent Activated Cell Sorter* ou FACS®. Ce module procure au cytomètre la capacité d'isoler et de récupérer une sous-population de cellules selon des critères définis par l'utilisateur pour permettre la mise en culture ou la réalisation directe d'analyses génomiques, protéomiques, ... Il existe deux grands types de cytomètres en flux permettant le tri cellulaire : les trieurs électrostatiques ou les trieurs à commutation de flux (trieurs mécaniques) [193]. Les premiers sont basés sur la formation de gouttelettes dans la chambre fluidique, chacune incluant en moyenne une cellule. Après son passage devant le faisceau laser pour analyse, chaque goutte d'intérêt devant être triée est chargée, les critères de tri ayant été définis au préalable par l'utilisateur. En fonction de leur charge, et donc des caractéristiques des cellules qu'elles transportent, les gouttes sont ensuite déviées par un champ électrique vers différents réservoirs de collecte. Ce système, onéreux, offre la possibilité de trier plusieurs dizaines de milliers de cellules par seconde. Les trieurs à commutation de flux constituent une alternative plus simple et plus abordable. Lorsqu'une cellule d'intérêt est identifiée à l'issue de l'analyse,

une valve commandée par un dispositif piézoélectrique oriente temporairement le flux vers la voie de collecte des cellules triées. Les débits atteignables sont toutefois limités à quelques centaines de cellules par seconde [105].



(Source : <http://www.unifr.ch/pathology/en/facs>)

Figure 16 : Principe général du fonctionnement d'un FACS permettant le tri de cellules par déflection électrostatique.

Les FACS permettent l'analyse d'une suspension hétérogène en faisant passer, cellule par cellule, devant un laser afin d'enregistrer les propriétés de diffusion de la lumière ainsi que la fluorescence émise par les cellules. Une fois le signal enregistré, les cellules sont isolées dans des gouttes et chargées en fonction du signal enregistré et du paramétrage de l'appareil. Finalement, des plaques à haute tension permettent d'orienter les différentes gouttes vers différentes sorties de l'appareil.

2) Avantages et Inconvénients

Les FACS® sont des systèmes de tri extrêmement performants. Avec un débit de traitement pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de cellules par seconde pour les meilleurs, ces appareils se caractérisent par un très haut niveau de sensibilité liée à une très grande spécificité. Ces caractéristiques permettent la capture jusqu'à des cellules uniques présentes dans un échantillon complexe [193,194] avec de nombreuses applications pour la détection d'événements rares, comme des transferts de gènes par exemple [135]. D'autres applications en microbiologie concernent notamment la détection de bactéries pathogènes dans des échantillons humains, alimentaires ou environnementaux, l'efficacité des systèmes développés permettant l'obtention rapide de diagnostics fiables. A noter que le FACS permet de trier les cellules marquées par immunomarquage [195] ainsi que par hybridation *in situ* [196].

Malgré leurs performances intéressantes, les FACS® restent des instruments onéreux avec des coûts d'entretien élevés et requérant un personnel qualifié pour leur utilisation. Ces équipements sont généralement acquis par des plateformes techniques communes à plusieurs équipes ou laboratoires ou pour des applications en diagnostic par des compagnies spécialisées [197]. Leur efficacité dépend par ailleurs de la pureté de la suspension à traiter, l'expérience montrant que les microbiotes extraits d'environnements complexes tels que les sols contaminés par la présence de minéraux peuvent difficilement être traités même si la littérature présente quelques exemples aboutis d'utilisation [160,196,198]. La présence dans ces milieux de microorganismes dotés naturellement d'autofluorescence est un autre obstacle à l'utilisation des FACS® dont la spécificité de tri est alors affaiblie.

B. Les trieurs de cellules macroscopiques basés sur le magnétisme

1) Les aimants permanents

La méthode la plus couramment employée pour isoler des cellules marquées avec des particules magnétiques repose sur l'utilisation d'un aimant permanent ou d'un électro aimant. L'aimant est mis au contact du récipient contenant l'échantillon, ce qui permet d'attirer les cellules marquées sur la paroi. Le surnageant contenant les cellules non marquées est aspiré à l'aide d'une pipette, tandis que les cellules cibles sont retenues sur la paroi. Ces dernières sont ensuite libérées de l'attraction magnétique par simple éloignement de l'aimant. Il existe des dispositifs commercialisés comme par exemple le portoir magnétique DynaMag™-2, adapté à la récupération d'entités marquées avec des billes de 1 à 4,5µm et pouvant traiter simultanément 16 échantillons. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12321D>).

Comme évoqué précédemment, le choix de la taille des particules conditionnera celui de l'aimant à utiliser pour la capture d'entités marquées magnétiquement. Le marquage de bactéries par des nanoparticules nécessitera le recours à des systèmes capables de générer de forts gradients de champ.

2) Le « Magnetic Activated Cell Sorter » ou MACS®

Le MACS® est un dispositif commercialisé par la société Miltenyi Biotec proposant des gradients de champ plus importants que ceux délivrés par les aimants macroscopiques standards. Le système consiste en une colonne en forme de seringue dont une partie est remplie de particules de fer servant de zone de séparation. Cette colonne, une fois placée dans un champ magnétique généré par un aimant permanent, va, grâce aux billes qu'elle contient, concentrer les lignes de champ et générer ainsi un gradient suffisant pour permettre la capture de nanoparticules superparamagnétiques de 50 nm. La suspension bactérienne introduite par le haut de la seringue migre sous l'effet de la gravité le long de cette dernière retenant les entités magnétiques, tandis que le reste de l'échantillon est élué vers l'embout. Une seconde étape d'élution hors champ magnétique permet la récupération de la fraction magnétique.

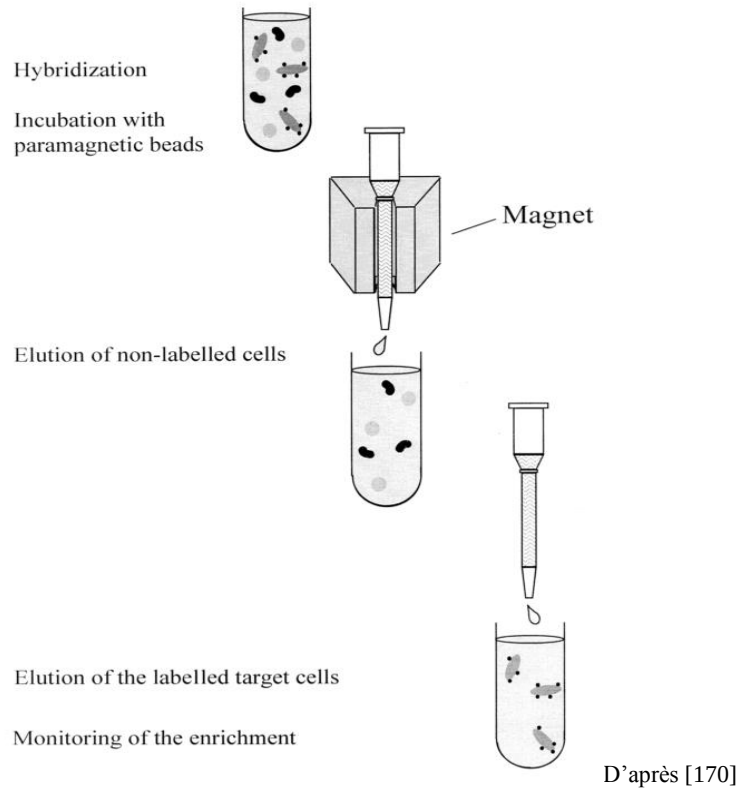


Figure 17 : Principe de fonctionnement du MACS®.

Les échantillons sont déposés au sommet de la colonne. Les cellules marquées magnétiquement y seront retenues alors que celles non marquées seront éluées. L'éluition des bactéries marquées se fait en éloignant la colonne de son support magnétique.

3) Avantages et Inconvénients

Ces dispositifs de tri sont beaucoup moins complexes et onéreux que les cytomètres à fluorescence présentés précédemment. De ce fait, la séparation magnétique a intégré la panoplie des outils de la microbiologie notamment pour la détection et l'isolement de bactéries pathogènes.

Ce type de séparation a également montré son intérêt dans un contexte d'écologie microbienne. Pratscher et ses collaborateurs ont ainsi utilisé des sondes polyribonucléotidiques magnétiques pour marquer et récupérer à l'aide d'un portoir magnétique les bactéries porteuses du gène *nirK* impliqué dans le cycle de l'azote [163]. Ces travaux ont cependant été réalisés sur des cellules bactériennes ayant été cultivées *in vitro* au laboratoire et non sur des échantillons environnementaux. Ce type de sondes a également été utilisé à des fins taxonomiques [170,172].

Couplé à une technique de Magneto-FISH, ce type de trieurs a permis d'aborder avec succès des problèmes conceptuels sur les relations fonctionnelles au sein des écosystèmes. Une relation de syntrophie entre archées et bactéries impliquées dans les processus d'oxydation du méthane a été établie par Pernthaler et collaborateurs [187]. Ces travaux confirment l'intérêt de ces technologies ciblant des populations sélectionnées pour aborder le problème complexe du fonctionnement des écosystèmes en complément des approches métagénomiques saturées par le niveau très élevé de la biodiversité microbienne environnementale.

Les outils disponibles à ce jour tels que les FACS® et le MACS® arborent aujourd'hui des performances très intéressantes et trouvent de très nombreuses applications dans les domaines de la microbiologie. Cependant, l'étude d'écosystèmes complexes comme les sols, caractérisés par la difficulté à purifier les matrices de contaminants de toutes natures, montre les limites de ces technologies. L'essor récent de la miniaturisation des technologies et de la microfluidique permet aujourd'hui le développement d'une nouvelle catégorie de trieurs basés sur des dispositifs avec une taille adaptée au matériel microbiologique.

C. Introduction à la microfluidique

La microfluidique regroupe la science et la technologie des systèmes permettant la manipulation de petits volumes de liquide et dont une ou plusieurs dimensions est de l'ordre du micromètre. Les domaines d'application de cette discipline sont extrêmement nombreux et variés, en biologie et notamment en microbiologie, mais également en chimie analytique, en génie des procédés, etc. La miniaturisation des systèmes apporte de nombreux avantages dont une réduction des volumes de réactifs, une plus grande vitesse de réaction, un encombrement moindre et de tout ceci découle une réduction des coûts de fabrication et d'utilisation.

Le comportement des fluides au sein des systèmes microfluidiques est une autre des caractéristiques les différenciant des dispositifs de taille supérieure. Dans les systèmes microfluidiques, les forces de viscosité dominent sur les forces d'inertie (faible nombre de Reynolds), ce qui se traduit par des écoulements laminaires (cf. figure 18). Nous verrons au

Chapitre 4 comment les systèmes microfluidiques tirent profit de ce type d'écoulement, permettant le développement de dispositifs de tri microfluidique en flux continu.

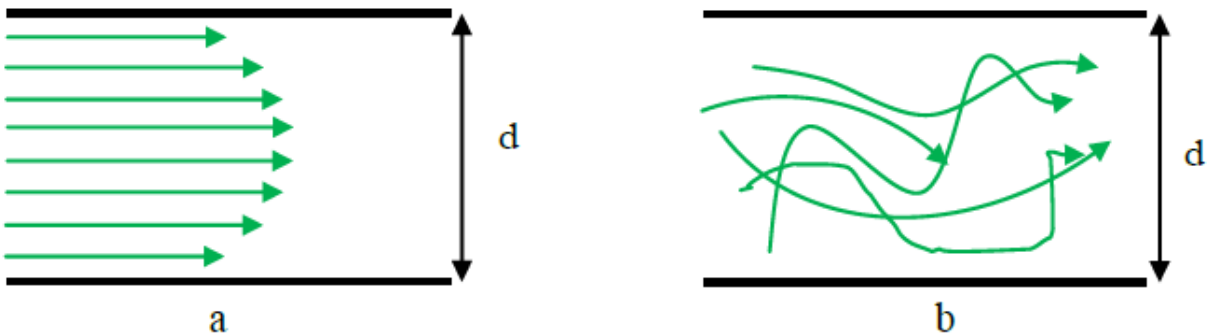


Figure 18 : Différents types d'écoulements fluidiques.

Les écoulements laminaires (a) et les écoulements turbulents (b). Diminuer la taille caractéristique d et la vitesse de l'écoulement tend à réduire le nombre de Reynolds et à favoriser les régimes laminaires

Ces dispositifs se caractérisent aussi par leur fort potentiel d'intégration, les processus de microfabrication permettant l'assemblage de modules microfluidiques différents. Ceci va permettre sur un même dispositif de réaliser les différentes étapes de traitement d'un échantillon, depuis sa préparation jusqu'à l'analyse des données, suivant le concept de « laboratoire sur puce » ou « *lab-on-chip* ». Ces dernières années ont vu l'explosion des exemples de réalisations concrètes de ce type d'outils, avec pour objectif de créer une alternative aux technologies classiquement utilisées en offrant un gain de performances, une plus grande accessibilité et des coûts moindres. Parmi les développements réalisés, de nombreux modules de tri ont vu le jour, notamment pour le tri de cellules bactériennes par détection de fluorescence, attraction magnétique ou par d'autres moyens.

D. Les micro-trieurs fluorescents

Les micro-trieurs de cellules basés sur la fluorescence ont une architecture similaire aux FACS®. Ils comprennent une zone de focalisation permettant aux cellules de défiler en file indienne au niveau de la zone de détection comportant une source d'excitation lumineuse et un dispositif d'enregistrement. Le dispositif mesure le niveau de fluorescence émis par chaque cellule, la

fenêtre d'analyse se trouvant en amont d'une jonction permettant d'orienter les cellules marquées vers différentes voies de sortie en fonction de la mesure effectuée.

Le premier exemple de cytomètre en flux microfluidique décrit remonte à 1975 [199] mais son réel développement date de 1999 [200], début de l'essor de la microfluidique. Le dispositif illustré sur la figure 19 est en forme de T dans lequel l'aiguillage des cellules est contrôlé par un champ électrique (électro-osmose) généré grâce à des électrodes localisées au niveau de chaque extrémité du T (1 entrée et 2 sorties). Le montage est réalisé de manière à ce que l'écoulement du liquide se fasse naturellement vers la sortie correspondant aux cellules non fluorescentes. Lorsqu'une cellule fluorescente est détectée au niveau de la zone d'analyse, les tensions appliquées aux électrodes sont modifiées afin de diriger la cellule marquée vers la sortie de récupération. Ce premier dispositif ne présente cependant pas encore les performances déjà atteintes avec un cytomètre en flux notamment en termes de débit (nombre de cellules analysées par seconde). Le débit du microsystème proposé par Fu et collaborateurs se situait aux alentours de la dizaine de cellules par seconde et son applicabilité à la sélection et au tri de cellules bactériennes de type *Escherichia coli* exprimant le gène *gfp* avait été rapidement démontrée [200].

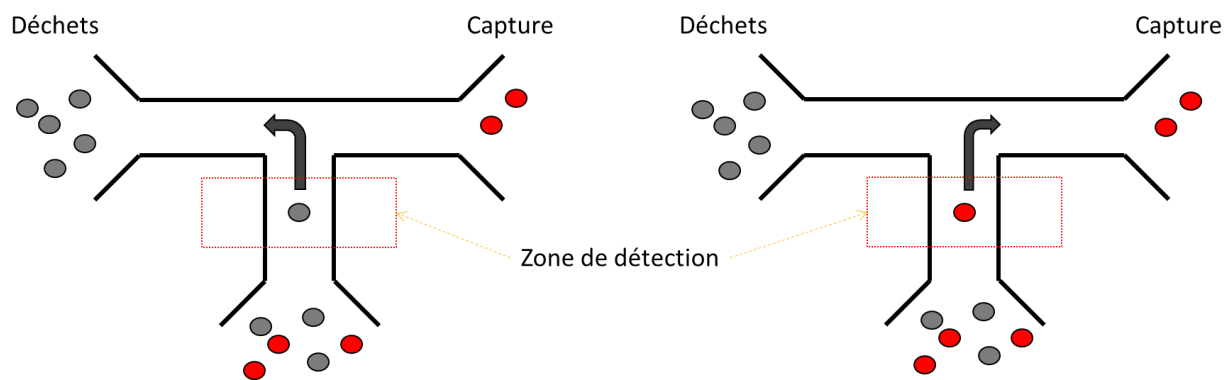


Figure 19 : Représentation schématique du premier μ FACS proposé en 1999 par Fu et collaborateurs [200].

Le microsystème en forme de T permet d'orienter les cellules vers une sortie ou l'autre après passage au niveau de la zone de détection.

Pendant près de quinze années, de nombreuses études se sont focalisées sur l'amélioration des différents modules constituant un μ FACS, à savoir la focalisation des cellules, la miniaturisation des dispositifs de manipulation des fluides, la miniaturisation des dispositifs optiques et enfin l'intégration de l'ensemble sur une même puce (cf. figure 20) [201].

Pendant longtemps ce type de dispositifs a peiné à s'imposer du fait de performances très limitées en termes de débit quand les besoins des biologistes exigeaient des systèmes pouvant traiter des échantillons contenant plusieurs millions et même milliards de cellules. C'est principalement au niveau de la vitesse de détection puis de séparation qu'ont été identifiées les limitations de ces dispositifs. Les avancées techniques sont cependant significatives et aujourd'hui, un dispositif de tri commence à être considéré « à *haut débit* » lorsqu'il permet de traiter 1000 cellules par seconde. C'est en effet des débits de ce type qui sont nécessaires si l'objectif est d'analyser exhaustivement un microbiote complexe (à partir d'un million de cellules, généralement beaucoup plus), d'y détecter et récupérer les populations faiblement représentées (biosphère rare) ou celles ayant subi un événement rare (transfert de gènes par exemple) représentant de l'ordre de 0.1 % à 0.01 % de la communauté. Les progrès technologiques permettent petit à petit de dépasser ces limites en proposant des dispositifs de tri à haut débit traitant jusqu'à 1500 cellules par seconde [202].

Enfin, indépendamment du débit, les biais liés à l'autofluorescence de certaines cellules et à la présence de contaminants fluorescents au sein de la suspension vont limiter la fiabilité des résultats de tri, comme c'était déjà le cas avec les trieurs fluorescents macroscopiques [203].

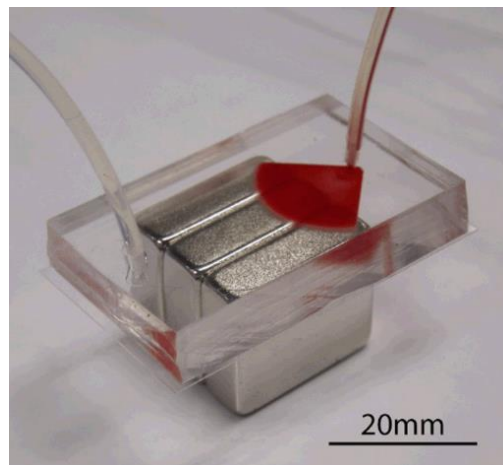
E. Les micro-trieurs magnétiques

Le développement de microsystèmes pour le tri cellulaire magnétique impose d'employer une source de champ qui permettra d'attirer les entités biologiques marquées. Cette source devra être conçue et positionnée par rapport à la chambre d'écoulement en gardant à l'esprit le fait que la densité du flux magnétique décroît rapidement avec la distance. Deux stratégies de fabrication de trieurs magnétiques microfluidiques sont décrites dans la littérature : la première consiste à placer un aimant permanent ou un électro aimant conventionnel à l'extérieur de la structure. La seconde

consiste à intégrer directement des aimants ou des électroaimants miniaturisés à l'intérieur du microsystème, en faisant appel à différentes techniques de microfabrication [204–208].

1) Les sources externes : les aimants permanents conventionnels

En raison de sa simplicité, la méthode consistant à approcher un aimant permanent conventionnel (c'est à dire de dimensions millimétriques ou centimétriques) du microcanal a été la première utilisée dans les systèmes de tri combinant microfluidique et magnétisme (cf. figure 20). Les aimants permanents les plus performants sont confectionnés à partir de terres rares : le néodyme (allié au fer et au bore) ou le samarium (allié au cobalt). On trouve aisément dans le commerce des aimants en NdFeB disponibles dans une large gamme de tailles et de formes (comme par exemple auprès du fournisseur Supermagnete). Ces aimants ont l'avantage de produire des champs intenses sur une distance relativement importante, mais le gradient généré, atteignant son maximum près des bords de l'aimant, a toutefois une valeur limitée à quelques dizaines ou quelques centaines de T/m, qui se révèle insuffisante pour permettre une attraction efficace des cellules marquées par des nanoparticules magnétiques [186,192].



D'après [209]

Figure 20 : Photographie d'un microsystème intégrant un aimant permanent pour la capture de cellules cancéreuses.

2) Sources intégrées

Compte tenu des limitations des aimants conventionnels en termes de gradients de champs générés, d'autres approches ont été développées, consistant à intégrer des structures magnétiques directement dans le microsystème, au plus proche de la chambre fluidique. Ces structures peuvent être des micro-électro-aimants, des structures en matériaux doux ayant la capacité d'être aimantées par une source externe, ou des micro-aimants permanents.

- **Les micro-électro-aimants**

Le principe d'un électro-aimant consiste à utiliser un courant électrique pour la production d'un champ magnétique. Les électroaimants intégrés se présentent généralement sous la forme d'une simple piste conductrice en cuivre ou en or [210] ou d'une bobine à enroulement plan (cf. figure 21). Ces sources de champs permettent de contrôler le champ appliqué : celui-ci peut être coupé par simple annulation du courant, ou modulé en intensité en faisant varier ce dernier. En revanche, l'intensité de champ produite demeure relativement faible en comparaison de celle d'un aimant permanent, du fait des échauffements induits par effet Joule qui limitent le courant maximum appliqué. Cette hausse de température doit être notamment surveillée lors de la manipulation d'échantillons biologiques, afin de préserver les échantillons.

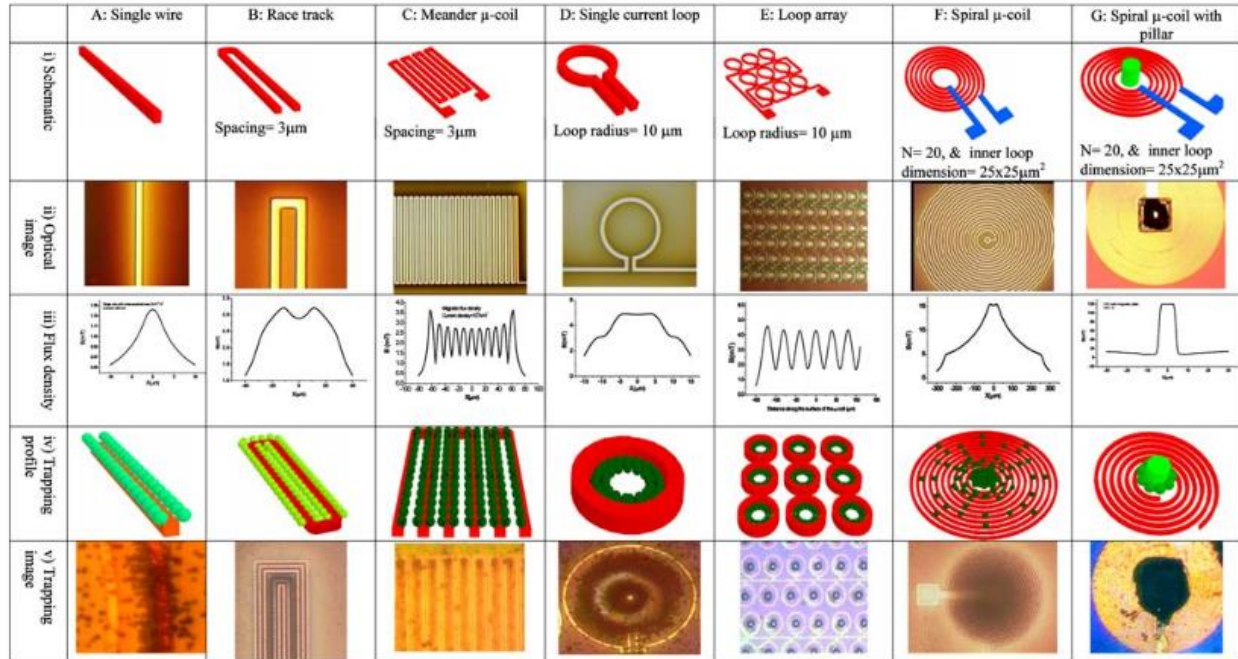


Figure 21 : Exemples de réalisations de micro-électro-aimants d'après [211].

- **Les micro-structures en matériaux doux**

Une autre approche permettant d'obtenir de forts gradients de champ consiste à intégrer des structures en matériaux magnétiques doux à proximité du microcanal et à les aimanter à l'aide d'une source externe telle qu'un aimant permanent conventionnel ou un électro-aimant. Ces microstructures sont réalisées à partir de différents matériaux ferromagnétiques comme le permalloy, [204] ou le nickel [206]. Leur aimantation peut être contrôlée en éloignant l'aimant ou en modulant l'intensité du courant dans le cas d'un électroaimant. L'avantage de cette solution réside dans le fait que les entités biologiques capturées par les microstructures peuvent être relâchées aisément par simple annulation du champ extérieur. En revanche, l'emploi d'une source de champ externe tend à diminuer la compacité du dispositif.

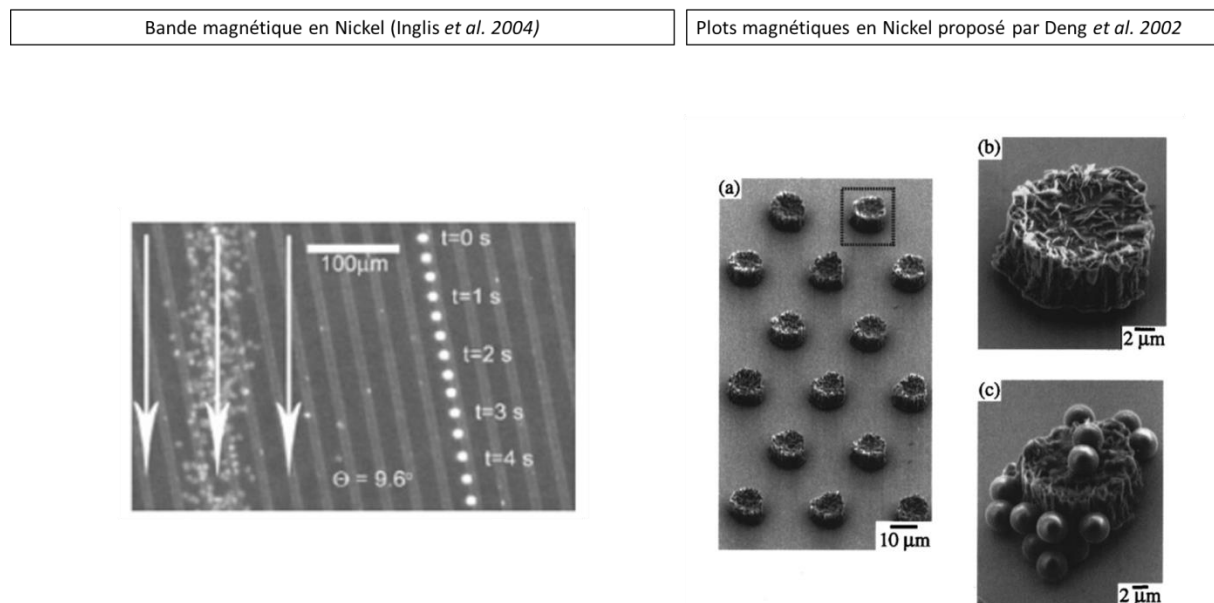


Figure 22 : Exemples d'aimants doux microstructurés intégrés dans des microsystèmes [206,212].

Ces microstructures intégrées peuvent également être réalisées à partir de polymères composites [213] produits par mélange de particules de fer (par exemple) et de Polydiméthylsiloxane ou PDMS (polymère classiquement utilisé pour la fabrication de microsystèmes). Ce point sera présenté plus en détail au chapitre 4.

- **Les micro-aimants permanents**

Des chercheurs de l'institut Néel (CNRS/UGA UPR2940, Grenoble) ont mis au point une technique permettant de micro-structurer des couches magnétiques en NdFeB afin d'obtenir des réseaux de micro-aimants permanents parfaitement plats et par conséquent aisément intégrables dans des canaux microfluidiques. Il s'agit de l'approche TMP (pour *ThermoMagnetic Patterning* [214]). Le procédé consiste à déposer un film magnétique de NdFeB par pulvérisation cathodique triode sur un support en silicium afin d'obtenir une couche épaisse de 5 μm environ, qui sera ensuite aimantée jusqu'à saturation. La technique TMP permet de renverser localement l'aimantation et d'obtenir ainsi une alternance de régions d'aimantation opposée (cf. figure 23). Cela implique de placer un masque comportant des ouvertures correspondant aux motifs souhaités sur le film aimanté, avant de procéder à un traitement de l'échantillon par laser nano-pulsé. La chaleur ainsi produite localement a pour effet de diminuer la valeur du champ coercitif ($-H_c$) (cf. figure 13) nécessaire pour désaimanter le film magnétique. Ainsi, grâce à l'application d'un champ magnétique de sens opposé au sens initial de l'aimantation, les zones chauffées verront leur aimantation changer de sens alors que celles ayant été protégées garderont leur aimantation d'origine. Cette technique a notamment permis de réaliser des réseaux d'aimants avec un motif en « damier », ainsi que des réseaux de carrés de 7 μm de côtés. Ces micro-aimants ont ensuite été intégrés dans des systèmes microfluidiques à des fins de capture de bactéries magnétiques [172,185,186] (cf. figure 24). Ils ont par ailleurs été employés à de nombreuses reprises dans les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit.

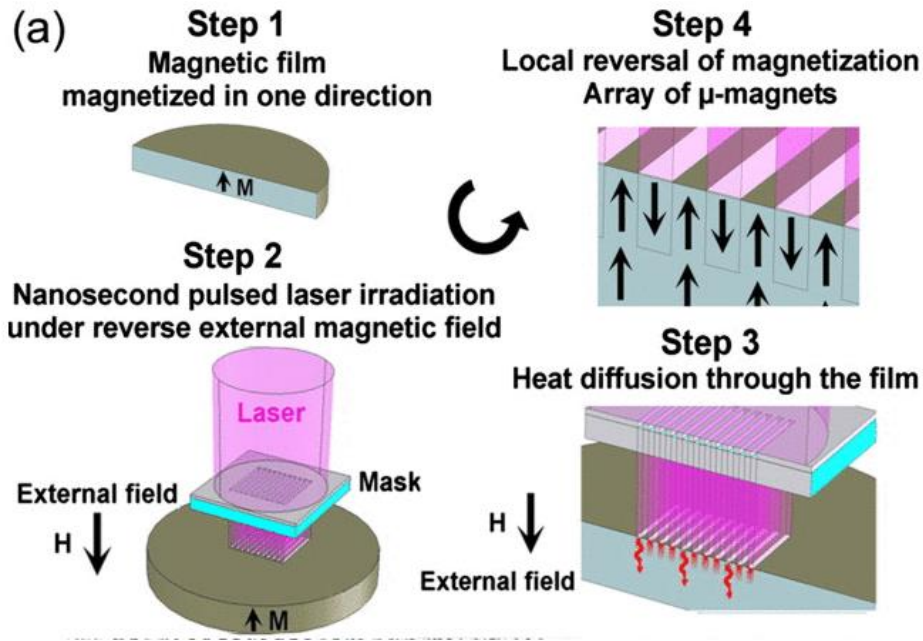


Figure 23 : Description du procédé TMP (Thermo Magnetic Patterning) permettant la micro-structuration de films magnétiques.

Un film en NdFeB d'épaisseur $5\ \mu\text{m}$ est aimanté à saturation dans une direction. Un masque est posé sur le film que l'on irradie pendant quelques nanosecondes à l'aide d'un laser pulsé permettant de chauffer la couche magnétique sur certaines parties, correspondant aux ouvertures du masque. En parallèle, un champ magnétique externe de direction opposée à la direction initiale d'aimantation du film de NdFeB est appliqué, ce qui permettra de renverser localement le sens de l'aimantation au niveau des zones chauffées par le laser et ainsi obtenir un réseau de zone micro-aimants

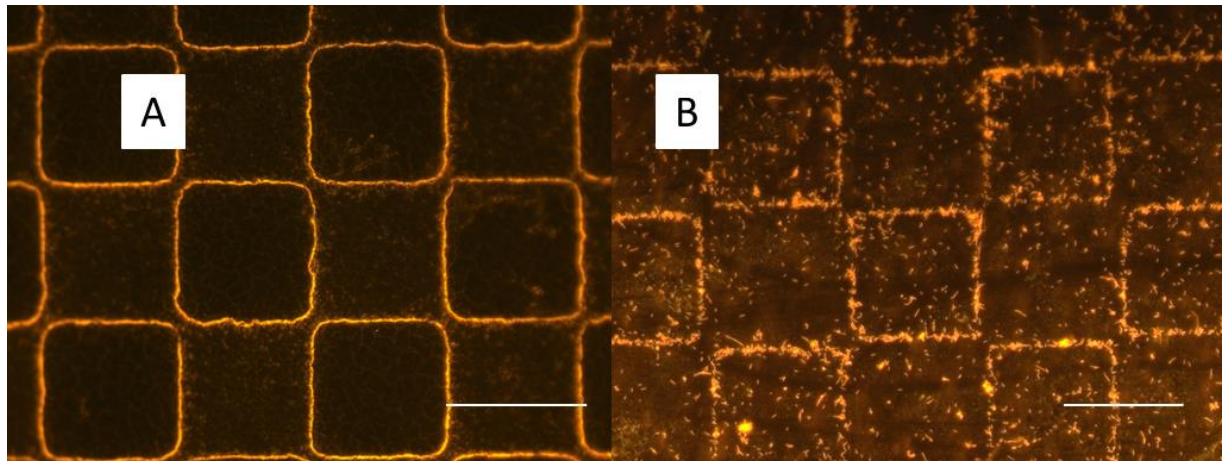


Figure 24 : Observation de billes magnétiques (A) ou de bactéries magnétiques (B) fluorescentes sur un réseau de micro-aimants de $100 \times 100\ \mu\text{m}$ (barre d'échelle = $100\ \mu\text{m}$). La structuration du film magnétique par l'approche TMP entraîne un agencement des particules ou bactéries marquées magnétiquement selon des motifs carrés.

F. Précédents travaux réalisés au laboratoire Ampère

Dans le cadre de sa thèse réalisée au laboratoire Ampère [215], Jérémy Pivetal a conduit des travaux préliminaires montrant la faisabilité du tri de bactéries marquées par hybridation magnétique *in situ* à l'aide d'un microsystème magnétique.

Ces travaux ont consisté dans un premier temps à réaliser l'intégration dans un canal microfluidique d'un réseau d'aimants permanents obtenus par la méthode TMP décrite précédemment et ont abouti à la mise au point d'un système de tri fonctionnel. Pour cela une fine couche de PDMS d'épaisseur 1 à 2 μm est étalée à la tournette sur les micro-aimants (cf. figure 25), et joue le rôle d'interface pour le collage du canal microfluidique par traitement plasma. Cette couche est suffisamment fine pour minimiser la perte d'attraction magnétique due à la distance entre les micro-aimants et la chambre d'écoulement et permet par ailleurs le collage réversible du canal microfluidique sur les aimants.

Un autre aspect de ces travaux a consisté à mettre à point une méthode de marquage des bactéries avec des nanoparticules magnétiques par hybridation moléculaire basée sur l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques s'appuyant sur les concepts de *probe-based cell fishing* [170] et de *network hypothesis* [183] introduits un peu plus tôt dans ce chapitre. La combinaison de ces deux développements (cf. figure 26) a permis de réaliser un enrichissement très important de bactéries cibles présentes en faible abondance dans un échantillon composé de bactéries de laboratoire. La solution initiale était constituée de 0,04 % de cellules cibles (*Escherichia coli* DH10 β) pour 99,96 % de non cibles (*Acinetobacter sp.* ADP1) et les sondes polyribonucléotidiques employées pour l'hybridation *in situ* magnétique étaient dirigées contre *E. coli*. Le tri a permis d'éliminer quasiment totalement les cellules non cibles (taux de contamination de 0,05 %) pour produire une suspension fortement enrichie en cellules cibles (pureté supérieure à 98 %). Bien qu'ayant démontré son fort potentiel pour la capture de souches de laboratoire, l'approche MISH (pour *Magnetic in situ Hybridization*) doit encore être développée avant de pouvoir être appliquée à des populations indigènes au sein de microbiotes complexes extraits d'échantillons environnementaux.

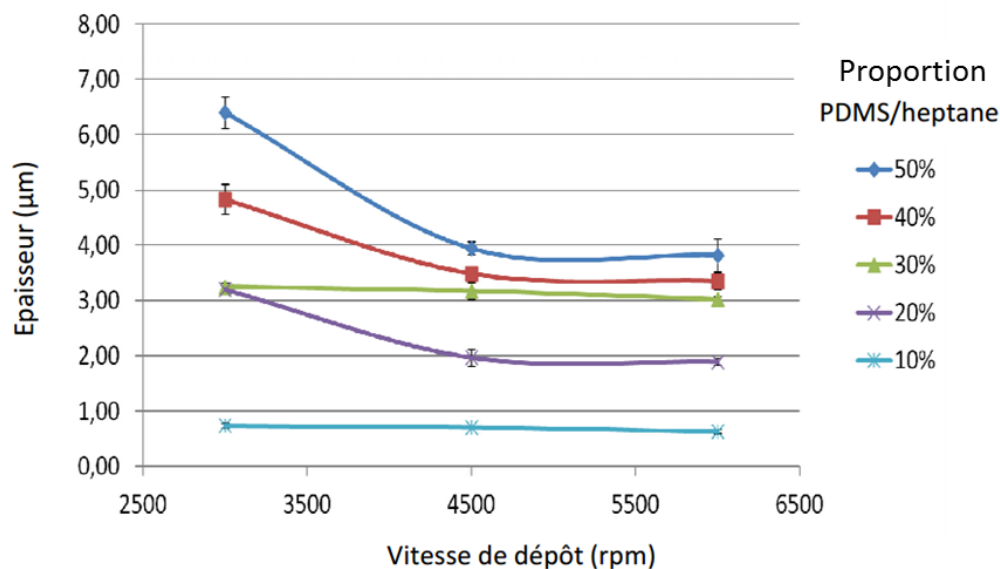


Figure 25 : Contrôle de l'épaisseur du film de PDMS déposé sur les micro-aimants.

Avant étalement à la tournette, le PDMS est dilué avec de l'heptane. L'épaisseur de la couche obtenue dépend du pourcentage massique PDMS/heptane ainsi que de la vitesse d'étalement (mesure par profilométrie).

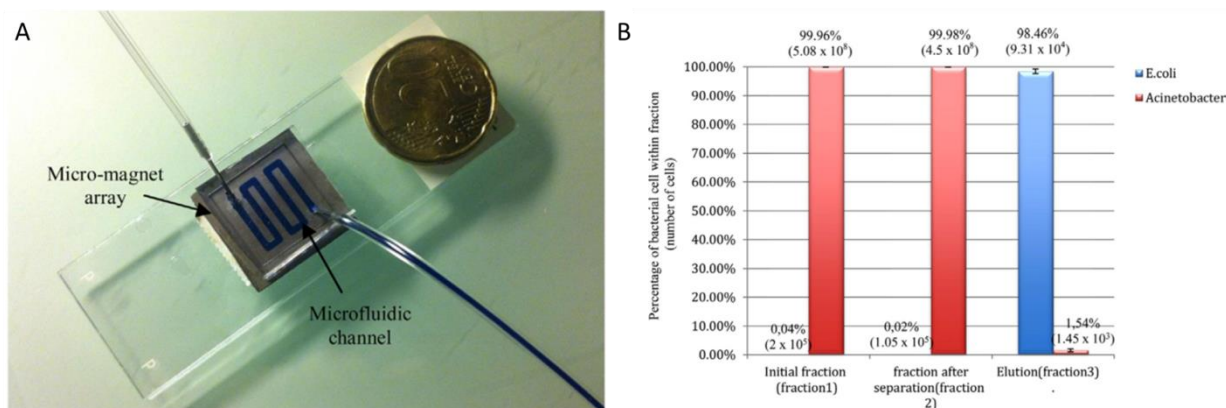


Figure 26: Photographie du microsysteme integrant un reseau de micro-aimants de 100 x 100 μ m

(B) résultats de qPCR sur une experimentation de tri cellulaire utilisant des sondes polyribonucléotidiques. Des cellules marquées (E.coli) par MISH (0.04 % dans fraction 1) en suspension avec des Acinetobacter sont capturées après passage dans le microsysteme magnétique (A) permettant d'obtenir une fraction magnétique enrichie comprenant 98,46 % d'E.coli.

VII. Conclusions

Ce chapitre nous a permis d'introduire les différents outils disponibles à ce jour pour réaliser le marquage puis la séparation de bactéries à partir d'un mélange complexe. Le choix du type de technologies à employer pour le marquage des bactéries est donc sujet à réflexion et sera déterminé par le type d'échantillons à disposition, le marqueur choisi (taxonomique ou fonctionnel), ainsi que l'état des connaissances scientifiques sur l'organisme.

Les différentes approches de marquage développées se caractérisent par des atouts propres à chacune d'entre elles mais aussi par des biais ou limites qui ne permettent pas d'en sélectionner une comme exempte d'inconvénients. Par exemple, l'immunomarquage, technique reconnue pour sa rapidité et sa spécificité convient parfaitement aux problématiques de détection des bactéries pathogènes, germes cultivés et bien caractérisés mais peut difficilement convenir à ceux dont il est difficile d'avoir une biomasse suffisante pour produire des anticorps. De manière toutefois moins systématique la caractérisation de sondes utilisables en hybridation *in situ* nécessite une connaissance de la séquence de fractions plus ou moins importantes du génome. Même si les bases de données de séquences pour des gènes comme 16S sont très importantes et vont continuer à s'accroître, elles sont encore loin d'être exhaustives et ne permettent pas de s'assurer de la totale spécificité des sondes caractérisées. Par ailleurs, la discrimination entre bactéries au sein d'une espèce ou même d'un genre peut ne reposer que sur un nombre très limité de mésappariements (et pour certains taxa cette discrimination sera même impossible du fait d'une totale identité des séquences au sein du marqueur choisi). Cette forte similarité imposera des conditions physico-chimiques d'hybridation extrêmement strictes si une forte spécificité est requise, qui ne pourront être définies qu'expérimentalement pour chaque type de sondes utilisées. Enfin, la viabilité des cellules est compromise par la nécessité d'un traitement préalable de fixation (afin de perméabiliser les cellules) limitant ainsi l'exploitation des cellules récupérées. La viabilité des cellules est assurée lorsque le marquage passe par une fonctionnalisation de surface avec des molécules fluorescentes ou des particules magnétiques mais sans qu'il soit réellement possible de discriminer des taxa particuliers au sein d'un mélange complexe dont la totalité des cellules sera similairement marquée.

Le type de marquage choisi déterminera le dispositif de tri à utiliser. Le FACS® pour les marqueurs fluorescents atteint aujourd'hui le très haut-débit mais son intérêt pour l'écologie microbienne est tempéré par les problèmes d'autofluorescence que ne rencontre pas le magnétisme qui est limité par des problèmes liés à la miniaturisation des nanoparticules et des aimants. Des dispositifs commerciaux comme le MACS® montrent que des solutions existent pour générer des gradients adaptés à la capture de cellules bactériennes marquées par des nanoparticules magnétiques.

Cette analyse des différentes options montre que le marquage magnétique semble être celle la mieux adaptée pour répondre aux défis de l'écologie microbienne que sont la détection et la récupération de populations bactériennes indigènes au sein de microbiotes complexes (écosystèmes de type sol ou sédiment). Le tri magnétique devrait être moins impacté que le tri fluorescent par le manque de pureté des suspensions bactériennes extraites de sol si l'on considère comme limité le magnétisme naturel de certaines populations. En termes de débit, le principe même de l'approche consistant à bloquer sur les aimants les cellules marquées par les nanoparticules tandis que sont éluées les autres, pose moins de problèmes pour traiter des volumes et des densités cellulaires importants que le passage successif de cellules individuelles devant un détecteur de fluorescence. Par ailleurs, la réduction d'échelle est un atout considérable pour la génération de champs magnétiques avec un gradient élevé dont la combinaison avec des dispositifs microfluidiques est extrêmement prometteuse pour la capture de cellules bactériennes marquées par des particules magnétiques de faible taille.

Un premier microsystème intégrant un réseau de micro-aimants permanents au fond du canal a pu être développé en collaboration avec les chercheurs de l'Institut Néel et du G2Elab. Ce dispositif a eu pour objectif de traiter des suspensions bactériennes constituées d'isolats bien caractérisés marqués par hybridation *in situ*. Les travaux présentés dans ce manuscrit se situent dans la directe continuité du développement de ces dernières approches de marquage et de tri magnétique. Nous développerons ainsi dans les prochains chapitres les différents travaux réalisés afin de continuer le développement du *MISH* avec l'objectif de rendre la plus opérationnelle possible la méthode de marquage des cellules bactériennes en montrant les résultats sous différentes conditions expérimentales. Dans le chapitre 2, nous présenterons les travaux mis en œuvre avec des souches bactériennes cultivées au laboratoire pour la mise au point des conditions d'hybridation avec la

technique de MISH mais aussi avec une autre approche de marquage magnétique. Ces travaux de mise au point seront suivis au chapitre 3 d'une première série d'expériences réalisées avec des bactéries extraites de sol où nous analyserons la biodiversité des différentes fractions récoltées au cours d'un enrichissement.

L'intégration de sources de champs magnétiques miniaturisées dans des canaux microfluidiques reste un défi très contraignant pour des laboratoires non spécialistes. Nous présenterons aussi au chapitre 4 une solution envisagée pour permettre le tri d'échantillons en flux continu qui a été développée avec l'objectif de proposer une technologie accessible à tous, y compris aux non spécialistes.

Chapitre 2 : Mise au point de méthodes de marquage des bactéries par hybridation *in situ* magnétique

I. Introduction

Du fait de biais liés à l'extraction de l'ADN metagénomique [216] et aux limites de la PCR, du séquençage et de la bioinformatique, le décryptage le plus exhaustif possible de la biodiversité bactérienne, notamment dans les écosystèmes telluriques ne peut s'envisager sans un recours à plusieurs approches complémentaires. Parmi celles-ci, l'analyse « fractionnée » du microbiote consistant à étudier populations après populations repose sur l'efficacité des méthodes de capture et d'extraction sélective de cellules bactériennes sélectionnées sur des critères taxonomiques ou fonctionnels. Différentes approches de marquage des cellules ont été développées parmi lesquelles l'hybridation des acides nucléiques dans la cellule (hybridation *in situ*) est particulièrement prometteuse du fait du haut niveau de spécificité atteignable. Le recours aux propriétés du magnétisme pour spécifiquement isoler et récupérer les cellules bactériennes ainsi marquées complèterait un protocole particulièrement adapté aux échantillons issus d'environnements complexes comme le sol.

L'hybridation de l'ARN simple brin avec une sonde nucléique tout comme celle de l'ADN ayant subi une dénaturation thermique ou chimique est régie par le niveau de complémentarité entre cible et sonde et par les paramètres physico-chimiques du milieu dans lequel se passe l'hybridation [143]. Des conditions d'hybridation drastiques ne devraient permettre le maintien que des duplex parfaitement appariés tandis que des conditions moins strictes vont autoriser le maintien de duplex comportant d'autant plus de mésappariements que les conditions d'hybridation seront ménagées. Utiliser l'hybridation *in situ* pour isoler des populations bactériennes spécifiques nécessite d'ajuster les conditions d'hybridation en fonction des objectifs recherchés. A titre d'exemple, on peut citer le marquage de populations bactériennes sur des critères taxonomiques où sélection des sondes complémentaires des régions de l'ARN ribosomique et « stringence » de l'hybridation devront être combinées pour marquer des cellules avec un niveau de spécificité pouvant aller de l'espèce au domaine.

La température est un paramètre couramment utilisé pour modifier la « stringence » d'une réaction d'hybridation, les duplex étant d'autant plus facilement déstabilisés par un accroissement de la température que le nombre de mésappariements va être élevé du fait d'une déstabilisation croissante de la double hélice d'acides nucléiques par rupture des liaisons hydrogènes. La température de dissociation va dépendre de la séquence de la région considérée, les bases G - C et A - T étant respectivement stabilisées par 3 et 2 liaisons hydrogène, l'énergie nécessaire à la dissociation variant ainsi selon le pourcentage G+C et la longueur de la sonde. Ces mêmes critères définiront la température optimale d'hybridation qui se calcule d'après la valeur de T_m pour *melting temperature*, correspondant à la température à laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé [143]. La position des mésappariements entre sondes et cible aura aussi un impact important sur l'hybridation. En effet, les hybrides non parfaits sont d'autant plus facile à déstabiliser que les mésappariements sont concentrés au milieu de la séquence de la sonde et non sur ses extrémités.

La concentration des ions sodium présents dans le tampon d'hybridation impacte aussi les phénomènes d'hybridation de par leurs interactions électrostatiques, principalement au niveau des groupements phosphates qui limitent les phénomènes de répulsion entre deux brins d'ADN. Une forte concentration saline agissant sur la stabilité de l'hybridation, la mise au point de conditions de « stringence » élevée s'attachera à décroître les concentrations en sel jusqu'au niveau où, pour une température donnée, seuls les duplex parfaitement appariés seront conservés. Ces conditions peuvent toutefois être modifiées par l'ajout dans le mélange réactionnel de solvants organiques qui réduisent la stabilité thermique de l'ADN. C'est notamment le cas du formamide, dérivé de l'acide formique qui agit comme un compétiteur pour les liaisons hydrogène avec les bases de l'ADN. Le formamide réduit la T_m pour les duplex ADN-ADN ou ADN-ARN proportionnellement à sa concentration (environ 0.72 °C pour chaque % de formamide). L'ajout de formamide dans le tampon d'hybridation permet ainsi de réaliser des hybridations à des températures beaucoup plus faibles que celles initialement calculées qui peuvent être très élevées et donc délétères pour l'échantillon [217].

Les valeurs de pH extrêmes (<5 à >9) affectent les propriétés d'hybridation, un tampon très basique rendant quasi nulle la charge des molécules d'acides nucléiques renforçant ainsi la « stringence » de l'hybridation et à l'inverse le pH bas générant un niveau si élevé de charges que l'hybridation entre deux brins d'acides nucléiques ne peut plus se réaliser.

Enfin les concentrations en ADN/ARN cibles et en sondes sont à considérer, une forte concentration en sondes augmentant la probabilité de rencontre entre sondes et cibles et diminuant le temps nécessaire à la totale hybridation. L'ajout à la solution réactionnelle de sulfate de dextran [218] ou de polyéthylène glycol [219,220] qui agissent comme des « *molecular crowding reagents* » permettent d'accroître localement la concentration en sondes dans le tampon contribuant à réduire le temps moyen nécessaire à l'hybridation.

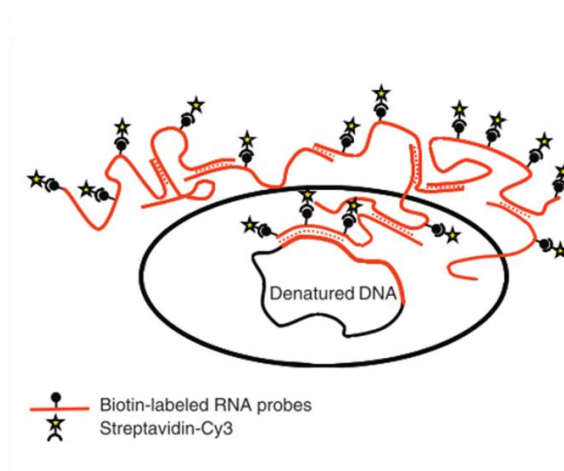
Dans le cadre de l'hybridation *in situ*, la fixation des échantillons est une étape importante précédant l'hybridation permettant de perméabiliser les cellules pour faciliter la pénétration des sondes dans les cellules et ce tout en préservant les composants et la morphologie cellulaire. Les protocoles de fixation sont classés en 2 groupes avec des fixations dites additives et des fixations dénaturantes [221].

La fixation additive, aussi appelée *cross-linking fixation*, met en jeu des solutions contenant des aldéhydes (formaldéhyde, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde,...) qui créent des liaisons covalentes entre les protéines avec l'avantage de préserver la structure des protéines et donc de la cellule. La fixation dénaturante a un impact plus important sur la structure des cellules. L'agent fixateur, le plus souvent un alcool (méthanol ou éthanol) potentiellement complété avec des agents tels que l'acétone ou l'acide acétique va perturber les interactions hydrophobes entre protéines ce qui modifie la structure tertiaire des protéines. Ce type de traitement pouvant provoquer une importante déformation des cellules et leur rétrécissement est plus rarement utilisé. Le traitement de fixation le plus utilisé pour des échantillons composés de suspensions bactériennes d'origine environnementale est basé sur l'utilisation de paraformaldéhyde à 3 %, requérant toutefois sa totale élimination après action afin d'éviter lors de l'étape suivante un pontage entre protéines fonctionnalisant les particules magnétiques et celles de la paroi bactérienne.

Dans nos travaux, la manipulation physique de cellules bactériennes spécifiques par hybridation *in situ* implique l'utilisation d'une sonde d'acides nucléiques qui, après hybridation avec sa cible, sera marquée par des nanoparticules magnétiques. Comme indiqué ci-dessus, la pénétration des sondes dans l'espace intracellulaire de la bactérie nécessite un traitement de perméabilisation des

enveloppes au paraformaldéhyde. Toutefois, le traitement s'avère insuffisant pour la pénétration des nanoparticules disponibles du fait de leur taille trop importante ce qui explique le manque de données dans la littérature sur l'utilisation des propriétés du magnétisme en hybridation *in situ* appliquée aux bactéries. Les seuls exemples disponibles à ce jour sont liés à l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques [170] justifiant nos travaux qui visaient au développement de protocoles optimisés à partir de 2 technologies d'hybridation *in situ* existantes pour le marquage magnétique et la capture de bactéries cibles.

A partir de l'approche « MISH » (*Magnetic in situ Hybridization*) basée sur l'emploi de sondes polyribonucléotidiques nous avons caractérisé des sondes de taille relativement longue (234 nucléotides) ciblant le domaine III de l'ARNr 23S. Ces sondes simple-brin ont été obtenues par transcription *in vitro* à l'aide d'une ARN polymérase. L'approche « MISH » a été développée en 1994 par Trebesius et collaborateurs [142] en vue d'accroître le signal de fluorescence de la technique FISH dans le cas de cibles en faible nombre de copies dans le génome [124]. L'hybridation « MISH » se caractérisait par une accumulation du signal de fluorescence au niveau de la périphérie de la cellule [183].



D'après [127]

Figure 27 : Principe du marquage avec des sondes polyribonucléotidiques selon l'hypothèse de la formation d'un réseau de sondes extracellulaires.

Des sondes polyribonucléotidiques (rouge) s'hybride partiellement avec leur séquence cible dans le génome de la cellule alors qu'une autre partie de ces sondes va aller s'hybrider avec certaines régions partiellement complémentaires avec d'autres sondes. Ceci amenant à la formation d'un réseau complexe de sonde dont la formation apparaît préférentiellement à la périphérie de la cellule entraînant l'apparition d'un signal de fluorescence caractéristique en forme de halo autour de la cellule marquée.

La seconde approche, la HCR (*Hybridization Chain Reaction*), dont le principe est décrit pour la première fois en 2004 par Dirks and Pierce [181], repose sur la formation d'un assemblage chevauchant entre deux molécules d'ADN complémentaires. La HCR qui permet d'augmenter significativement la sensibilité de l'hybridation est donc particulièrement prometteuse en microbiologie [179]. Trois sondes sont successivement utilisées, la première, non marquée a été caractérisée de façon à intégrer la séquence complémentaire de la cible sur laquelle sera basée l'hybridation ainsi qu'une petite séquence dénommée initiatrice (cf. figure 28). Cette première sonde servant d'ancrage de la réaction d'hybridation en chaîne est utilisée dans un protocole d'hybridation découlant du FISH.

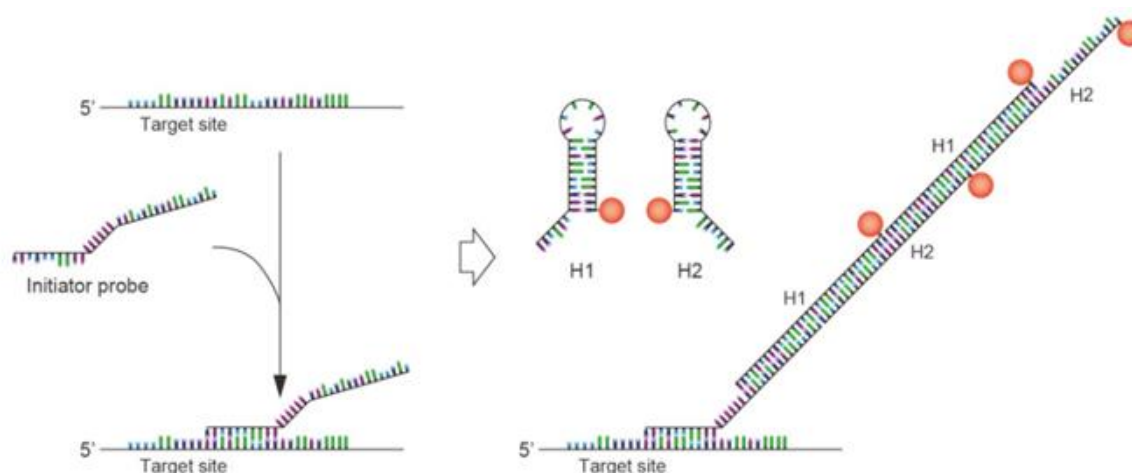


Figure 28 : Schéma du fonctionnement du marquage d'acides nucléiques par la technique de HCR.

Une première hybridation est réalisée en utilisant la sonde initiatrice. L'amplification du signal d'hybridation est réalisée à l'aide des sondes H1 et H2 qui formeront une longue chaîne dans une série d'hybridations à partir de la partie libre sur la sonde initiatrice.

L'amplification du signal a lieu dans une seconde étape utilisant les deux brins d'ADN marqués (H1 et H2) formant naturellement des épingles qui après dénaturation pourront s'assembler les unes aux autres dans une cascade d'hybridations en chaîne rendue possible par la présence de l'initiateur dans le milieu réactionnel donc lorsqu'il y a eu hybridation avec la sonde initiatrice. Utilisée pour le marquage de bactéries par fluorescence, [179,222] la HCR ainsi que ses nombreuses déclinaisons en cours de développement est un outil très prometteur dans le cadre d'une application à la capture de bactéries sur la base d'un marquage par des nanoparticules

magnétiques, du fait de la formation d'un long fragment d'ADN pouvant atteindre une taille importante, de l'ordre de plusieurs milliers de paires de bases [181] (cf. figure 29).

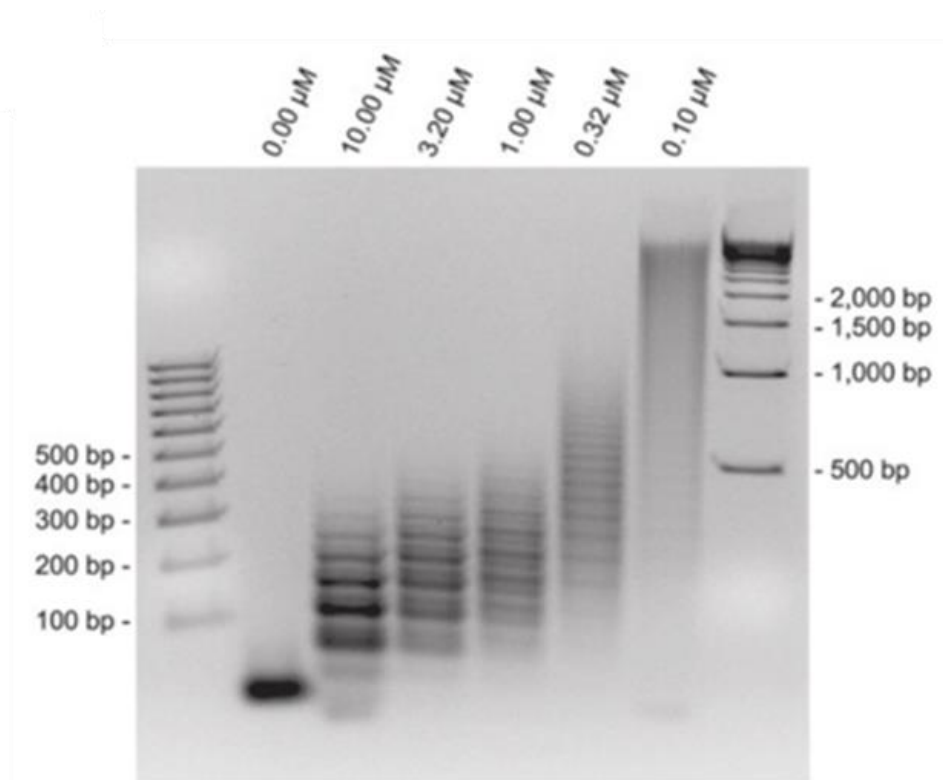


Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'assemblage entre les deux sondes amplificatrices en fonction de la concentration en sondes initiatrices.

Colonne 2 à 7 : 6 différentes concentrations sondes en initiatrices (0.00 jusqu'à 0.10 μ M) mélangées avec un mixte des sondes H1 et H2 (1M). Colonnes 1 et 8 : échelles de poids moléculaire.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 29, la structure secondaire issue de l'assemblage entre les deux sondes amplificatrices peut atteindre plusieurs milliers de paires de bases si la concentration initiale en sondes initiatrices est adaptée. C'est donc la concentration en sondes initiatrices à l'origine de la réaction en chaîne qui déterminera la taille de l'assemblage, celle-ci étant inversement proportionnelle à la valeur de la concentration en sondes initiatrices. Cette structure secondaire de taille significative, située à l'extérieur de la cellule et liée à la première sonde hybridée sur la cible ADN ou ARN dans la cellule se positionne alors comme candidate pour réaliser la liaison chimique avec les nanoparticules qui de ce fait n'auront pas à pénétrer la cellule. Nous présentons dans ce chapitre les travaux visant à développer ces différentes approches techniques ainsi que les résultats concernant leur spécificité et sensibilité.

II. Matériels et Méthodes

A. Préparation des échantillons

1) Souches utilisées

Les différents travaux ont été réalisés sur des souches appartenant au phylum des protéobactéries, incluant *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp.* ADP1 déjà utilisées au laboratoire dans le cadre de travaux préliminaires [172], auxquelles a été ajoutée une souche de *Pseudomonas putida*, bactérie environnementale très ubiquiste dont certains représentants ont leur génome totalement séquencé [223]. Ces souches ont été commandées auprès du fournisseur DSMZ et ont été cultivées selon leurs recommandations résumées dans le tableau suivant :

Nom	Référence DSMZ	Milieu de culture	Température culture
<i>Escherichia coli</i> DH5a	DSM 0414	Luria Bertani (LB)	37 °C
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Nutrient broth (NB)	29 °C
<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1	DSM 27193	Nutrient broth (NB)	29 °C

Tableau 1 : Référence des trois souches utilisées pour les travaux préliminaires de mise au point du marquage.

- Culture *in vitro* et extraction d'ADN

Une centaine de microlitres de chaque pré-culture est systématiquement utilisée pour inoculer 4,9 millilitres de milieu pour incubation subséquente jusqu'à la phase exponentielle de croissance de la bactérie (D.O (600) ~0.8).

Lorsque cela s'est avéré nécessaire, l'ADN des bactéries a été extrait en utilisant le kit Nucleospin Tissue® (Macherey Nagel) en suivant les indications du fournisseur puis quantifié à l'aide du kit « Qubit dsDNA BR assay kit ».

- **Fixation des cellules**

A partir de cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance (Densité optique = 0.8), les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde. Pour cela, 1 ml de la culture a été prélevé puis centrifugé pendant 5 minutes à $10000 \times g$, le culot cellulaire étant remis en suspension dans 1 ml d'une solution de paraformaldéhyde (3 %) fraîchement préparée pour incubation à 4 °C pendant 12 heures. Une fois fixées, les bactéries ont été centrifugées (5 minutes à $10\,000 \times g$) puis remises en suspension dans un volume suffisant de PBS avant d'être à nouveau centrifugées, cette étape de lavage étant répétée à 3 reprises afin d'éliminer toute trace du paraformaldéhyde de l'échantillon. Les cellules sont finalement remises en suspension dans 1 ml du tampon PBS.

- **Contrôle du marquage et de l'absence d'adsorption aspécifique**

Le marquage magnétique a été contrôlé, pour toutes les expériences réalisées, par un diagnostic visuel à l'aide des réseaux de micro-aimants fournis par l'institut Néel (100 x 100 μm ou 50 x 50 μm) en comparant une suspension de cellules n'ayant subi que les traitements de fixation et de lavage à celle pour laquelle les cellules fixées ont été confrontées au reste du protocole d'hybridation. Pour le contrôle impliquant les cellules simplement fixées, 500 μl de la suspension de bactéries dans du PBS ont été incubés avec 10 μl de la suspension de nanoparticules magnétiques (Streptavidin Microbeads – Miltenyi Biotec) pendant 12 heures à 4 °C. Le contrôle sur les cellules hybridées a été réalisé sur des cellules fixées soumises au protocole d'hybridation *in situ* mais en l'absence de sondes dans le tampon d'hybridation. La visualisation a été effectuée après marquage de l'ADN grâce à l'ajout de 1 μl d'une solution de bromure d'éthidium (0.1 mg/ml) avant dépôt de 15 μl de la suspension sur un réseau de micro-aimants pour observation à l'aide d'un microscope à épifluorescence (ZEISS AxioImager I).

B. Technique « MISH » : marquage de bactéries par sondes polyribonucléotidiques

1) Synthèse des sondes biotinylées

Les sondes polyribonucléotidiques sont obtenues par transcription *in vitro* à partir d'un produit PCR résultant d'une réaction d'amplification en utilisant comme matrice l'ADN extrait des souches cultivées et ciblant le domaine III du gène 23S en utilisant les amorces : 1900V [162] (5'-MAD GCG TAG BCG AWG G-3') et 317RT [170] (5'-**TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GAC CWG TGT CSG TTT HBG TAC**-3') contenant la séquence du promoteur de l'ARN polymérase T7 (**en gras**) nécessaire pour la suite du protocole.

Le cycle PCR comprend une première étape d'incubation à 95 °C pendant 10 minutes, puis 35 cycles regroupant les trois étapes suivantes : 95 °C pendant 30 secondes, 53 °C pendant 1 minute puis 72 °C pendant 1 minute 30 secondes; une dernière étape d'incubation à 72 °C de 10 minutes termine la réaction d'amplification. Cette dernière permet d'obtenir un produit PCR d'environ 250 nucléotides dont la taille sera systématiquement contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les sondes sont synthétisées par transcription *in vitro* à partir des produits PCR préalablement purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit « *AmpliscribeTM T7-FlashTM Biotin RNA Transcription Kit* » en suivant les recommandations du fournisseur. Ce kit contient une ARN polymérase T7 ainsi que des nucléotides A, G, C ainsi que des Uraciles biotinylés qui permettront d'obtenir en une seule étape de transcription des sondes ARN porteuses de nombreuses biotines. Les sondes sont ensuite purifiées sur colonne avec un gel de Sephadex (illustraTM MicrospinTM G-50 Column GE Healthcare), permettant en l'espace de deux centrifugations d'obtenir une solution propre en ARN qui pourra être finalement quantifiée par spectrophotométrie (NanophotometerTM IMPLEN).

2) Marquage par hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

Quelques microlitres de la solution de bactéries fixées ont été déposés sur une lame de microscope à l'air libre jusqu'à séchage, les cellules étant ensuite déshydratées par incubation durant 3 minutes dans des bains successifs d'éthanol (50, 80 et 96 %). La lame a été recouverte par le tampon d'hybridation (100 mM NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM Tris HCl pH 8, 5 mM EDTA pH 8 et 60-95 % formamide (volume/volume)) contenant environ 200 ng de sondes biotinylées fraîchement préparées. Les échantillons sont ensuite incubés dans une enceinte à hybridation à 80°C pendant 20 minutes, puis à 53-68 °C pendant la nuit.

Après hybridation, les lames sont rincées avec de l'eau puis mises à incuber avec une solution de streptavidine-Cy3 (ZyMAX™ Streptavidin-Cy3 Conjugated - Invitrogen) (20 ng/ml) pendant 15 minutes à l'obscurité avant observation au microscope à épifluorescence (ZEISS AxioImager I) avec les filtres adaptés (DsRed exc = 545/25 nm ; emm = 605/70).

3) Marquage par hybridation *in situ* magnétique (MISH)

Les hybridations *in situ* magnétiques ont été réalisées en milieu liquide. Pour cela, les cellules fixées ont été centrifugées pendant 5 minutes à $10000 \times g$ puis remises en suspension dans un tampon d'hybridation (100 mM NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM Tris HCl pH 8, 5 mM EDTA pH 8 et 60-95 % formamide (volume/volume)). 100 μ l (10^7 cellules) de cette suspension ont été placés dans un tube PCR dans lequel ont été ajoutés 2 μ g de sondes biotinylées fraîchement préparées. Ce mélange est ensuite incubé à 80 °C pendant 20 minutes puis à 53-68 °C pendant 4 heures. Après hybridation, les cellules hybridées ont été lavées par un cycle de centrifugation-remise en suspension dans 100 μ l de PBS avant remise en suspension finale dans ce même volume de PBS auquel ont été ajoutés 10 μ l de nanoparticules magnétiques (Streptavidin Microbeads – Miltenyi Biotec).

C. Hybridation en chaîne ou HCR

1) Sondes utilisées

Les caractéristiques des sondes utilisées sont résumées dans le tableau suivant :

	Nom	Biotine	Séquence (5' - 3')	Référence
1	Eub338		gctgcctccgtaggagt	Amann et al. 1990
2	Eub338-I-b	+	ccgaatacaaaagcatcaacgactagaaaaagctgcctccgtaggagt	Yamaguchi et al. 2015
3	Eub338-I		ccgaatacaaaagcatcaacgactagaaaaagctgcctccgtaggagt	
4	H1		tctagtcgttgatgctttgtattcggcgacagataaccgaatacaaaagcatc	
5	H2		ccgaatacaaaagcatcaacgactagagatgctttgtattcggttatctgtcg	
6	H1-b	+	tctagtcgttgatgctttgtattcggcgacagataaccgaatacaaaagcatc	
7	H2-b	+	ccgaatacaaaagcatcaacgactagagatgctttgtattcggttatctgtcg	
8	ECO1167		gcataagcgtcgctgccg	
9	ACA652		atcctctcccatactcta	
10	Ppu		gctggcctaaccttc	
11	ECO1167-I		ccgaatacaaaagcatcaacgactagaaaaagcataagcgtcgctgccg	
12	ACA652-I		ccgaatacaaaagcatcaacgactagaaaaaatcctctcccatactcta	
13	Ppu-I		ccgaatacaaaagcatcaacgactagaaaaagctggcctaaccttc	

Tableau 2 : Sondes sélectionnées pour les marquages de type HCR.

2) Stratégie des expériences préliminaires

Afin d'illustrer le potentiel du marquage HCR magnétique, une série de marquages a été réalisée, suivant le plan d'expériences décrit dans le tableau suivant :

	Sonde	H1	H2	H1-b	H2-b
1	Eub-I-b				
2	Eub			+	+
3	Eub-I	+	+		
4	Eub-I			+	+
5	Eub-I			+	
6	Eub-I				+

Tableau 3: Plan d'expérimentation préliminaire pour vérifier le bon fonctionnement de la HCR.

Ligne 1 : sondes Eub338 avec la partie « initiateur » biotinylée, contrôle négatif sur la nécessité de la formation des duplex H1/H2. **Ligne 2** : sonde Eub338 sans initiateur avec les sondes amplificatrices H1 et H2, contrôle sur l'importance de la séquence initiatrice. **Ligne 3** : réaction complète de HCR mais sans biotine, contrôle visant à vérifier l'absence d'adsorption aspécifique des nanoparticules magnétiques. **Ligne 4** : réaction HCR complète, témoin « positif ». **Ligne 5 et 6** : réactions HCR incomplètes avec uniquement une seule des sondes amplificatrices, contrôle de l'importance de la formation des duplex H1/H2.

3) Marquage fluorescent

Quelques microlitres de la solution de bactéries fixées sont déposés sur une lame de microscope pour séchage à l'air libre, les cellules étant ensuite déshydratées par incubation dans des bains successifs d'éthanol (50, 80 et 96 %) pendant 3 minutes. Les bactéries sont ensuite recouvertes du tampon d'hybridation (100 mM NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM Tris HCl pH 8, 5 mM EDTA pH 8 et 0-40 % formamide (volume/volume)) contenant environ 200 ng de sondes initiatrices. Les échantillons sont ensuite incubés dans une enceinte à hybridation à 80 °C pendant 20 minutes, puis dans une seconde enceinte à 53-68C °C pendant la nuit.

Avant de réaliser la réaction d'amplification, les sondes H1 et H2 sont incubées pendant 1 minute 30 secondes à 95 °C afin de les dénaturer et d'ouvrir leur structure en forme d'épingle, puis

laissées à température ambiante pendant 20 minutes avant d'être ajoutées à hauteur de 2,5 μM chacune aux échantillons qui sont ensuite incubés à 46 °C pendant 2 heures.

Après hybridation et un rinçage des lames avec de l'eau, les lames sont mises à incuber avec une solution de streptavidine-Cy3 (ZyMAX™ Streptavidin-Cy3 Conjugated - Invitrogen) pendant 15 minutes à l'obscurité et observées au microscope à épifluorescence (ZEISS AxioImager I) équipé des filtres adaptés (DsRed exc = 545/25 nm ; emm = 605/70).

4) Marquage magnétique

Des bactéries fixées (environ 10^7 cellules) sont mises en suspension dans 100 μl de tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, 0.01 % SDS, 0-40 % formamide) auquel 0.5 μM de sondes initiatrices sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 4h à 48 °C.

Après cette première étape d'hybridation, les cellules sont transférées dans un tube de 1 ml dans lequel 900 μl de tampon de lavage (tampon d'hybridation sans sondes) chaud (48 °C) sont ajoutés et les cellules sont ensuite lavées par 3 cycles de centrifugation de 5 minutes à $10000 \times g$ puis remises en suspension avec ce même tampon de lavage. Après lavage, les cellules sont reprises dans 100 μl de tampon d'amplification (50 mM Na_2HPO_4 , 0.9 M NaCl, 0.01 % SDS).

Avant de réaliser la réaction d'amplification, les sondes H1 et H2 sont soumises au même traitement qu'indiqué précédemment.

Après cette seconde étape d'hybridation, les échantillons sont à nouveau centrifugés pendant 5 minutes à $10\,000 \times g$ pour être ensuite repris dans 100 μl PBS froid (incubé dans la glace) afin d'éviter toute cassure du marquage. Finalement 5-10 μl de nanoparticules magnétiques (Streptavidin Microbeads – Miltenyi) sont ajoutés et les échantillons sont mis à incuber pendant la nuit à 4 °C.

D. Tri de bactéries dans un microsysteme magnétique

1) Fabrication du microsysteme :

La première étape consiste à réaliser un moule pour le canal en PDMS par photolithographie en utilisant la résine négative SU8-2035 (MicroChem[®]). Sur une lame de verre préalablement nettoyée avec de l'acétone puis de l'éthanol (70 %), une couche de 50 µm environ de résine photosensible SU8 2035 (MicroChem) est étalée par centrifugation à 500 rpm pendant 12 secondes puis 2000 rpm pendant 30 secondes. Le support est ensuite placé sur une plaque chauffante à 65 °C pendant 2 minutes puis à 95 °C pendant 8 minutes. Après ce premier recuit, la résine est insolée sous lampe UV (KLOE UV-KUB 25 mW/cm²) à travers un masque en plastique portant le motif du canal (réalisé sous CleWin et imprimé par Cirly) pendant 12 secondes. Après insolation, un second recuit est effectué sur plaque chauffante à 65 °C pendant 1 minute 30 puis à 95 °C pendant 6 minutes 30. Le moule est finalement obtenu par développement de la résine insolée dans une solution de Propylène Glycol Monomethyl Ether Acétate (PGMEA-Sigma Aldrich). Pour finir, les lames sont rincées à l'isopropanol puis séchées sous flux d'azote. Le PDMS liquide (Sylgard[®] 184) est mélangé avec son agent réticulant dans les proportions massiques 10:1. Le mélange est dégazé puis versé sur le moule et chauffé à l'étuve à 80 °C pendant 1 heure. Après réticulation et démoulage du PDMS, des ouvertures sont formées aux deux extrémités du microcanal à l'aide d'un poinçon, pour permettre l'introduction des tubes permettant l'injection des fluides. Le bloc de PDMS intégrant le microcanal est finalement collé par traitement plasma sur un réseau de micro-aimants. Pour cela, le réseau d'aimants TMP est préalablement recouvert d'une fine couche de PDMS obtenue en étalant à la tournette (4500 rpm pendant 1 minute) un mélange PDMS/heptane (10 % m/m) (cf. figure 25). Après chauffage à l'étuve pendant 1h à 80 °C, la fine couche de PDMS est exposée à un plasma d'air (Harrick Plasma Cleaner), durant 3 minutes, en même temps que le microcanal à sceller. Après mise en contact des deux surfaces, un collage irréversible est obtenu entre la fine couche et le canal, et réversible entre la fine couche et le réseau de micro-aimants (cf. figure 30).

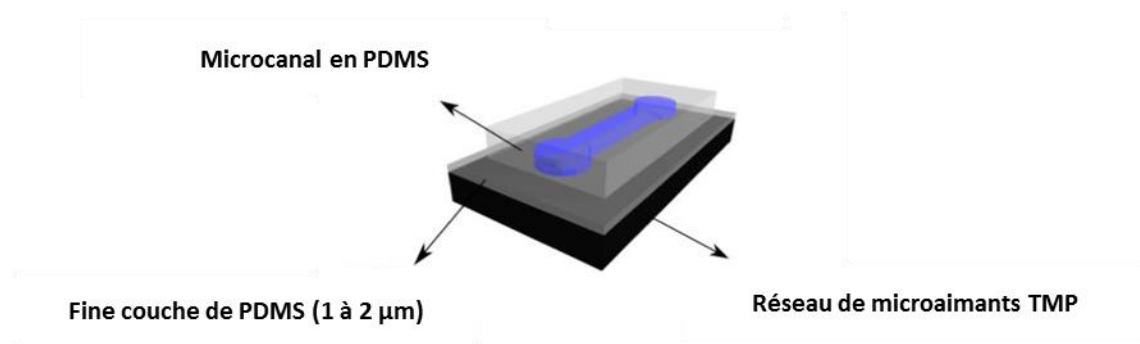


Figure 30 : Représentation schématique du dispositif [172,224]

2) Tri cellulaire :

A partir des échantillons de bactéries marquées par hybridation *in situ* magnétique, 50 μ l sont prélevés afin de constituer la fraction 1 ou fraction d'entrée. Le reste de l'échantillon est injecté sous débit constant (1 μ l/min) dans le microsystème magnétique jusqu'à passage complet de l'échantillon. La solution récupérée en sortie du microsystème constituera la fraction 2 ou fraction négative. Les cellules retenues dans le microsystème sont ensuite récupérées en faisant passer 100 μ l d'une solution de PBS sous un débit beaucoup plus important (250 μ l/min) pour récolter la fraction 3 ou fraction magnétique.

E. PCR quantitative

Une série de réactions de PCR quantitatives (qPCR) a été réalisée sur les différentes fractions récoltées au cours de l'expérimentation de tri sur microsystèmes en ciblant le gène 16S à l'aide des amorces 338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') et 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') [225]. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide du kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit, en suivant les recommandations du fournisseur avec le cycle suivant : une première étape d'incubation à 95 °C pendant 3 minutes, suivie de 30 cycles de 3 étapes à 95, 55 et 72 °C respectivement pendant 15, 20 et 25 secondes.

III. Résultats et discussion

A. Hybridation *in situ* magnétique avec une sonde courte

L'hybridation *in situ* dans son format le plus simple (telle qu'elle est le plus souvent opérée, avec des sondes courtes pénétrant intégralement dans la cellule) est une technique reconnue pour l'identification de bactéries au sein d'un échantillon complexe. Cependant, l'application à la capture de bactéries environnementales est un réel défi en raison de l'incapacité des nanoparticules magnétiques à traverser les enveloppes (paroi et membrane) bactériennes comme en témoignent les résultats d'hybridation *in situ* avec une sonde EUB338 (dite universelle car complémentaire d'une région de l'ARN ribosomique hautement conservée chez toutes les bactéries) biotinylée (cf. figure 31-2) où l'absence des motifs en forme de carrés illustre le non-marquage des bactéries contrairement aux résultats obtenus lors de l'immunomarquage magnétique (cf. figure 31-1) ou du marquage avec des sondes polyribonucléotidiques (cf. figure 26-b).

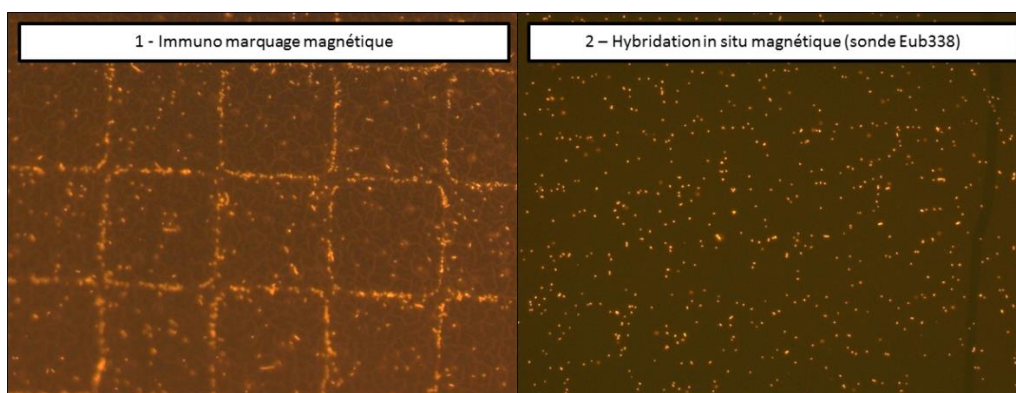


Figure 31 : Comparatif Immunomarquage magnétique (1) et hybridation *in situ* magnétique avec une sonde oligonucléotidique (Eub338) (2).

(1) Immunomarquage d'*Escherichia coli* avec des anticorps biotinylés couplés à des nanoparticules magnétiques recouvertes de streptavidine. L'agencement des bactéries suivant les motifs carrés du réseau de micro-aimants confirme l'efficacité du marquage. (2) Exemple de résultats obtenus en hybridation magnétique avec une sonde oligonucléotidique (EUB338) biotinylée : les bactéries se positionnent de manière aléatoire sur le réseau de micro-aimants, ce qui traduit l'échec du greffage des particules magnétiques sur les bactéries.

B. Marquage avec des sondes polyribonucléotidiques (MISH)

Le concept de « *probe based cell fishing* » introduit par les travaux de Stoffels et collaborateurs [170] repose sur l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques. Ces sondes permettent de cibler le domaine III de l'ARNr 23S, un marqueur pouvant être utilisé pour l'identification taxonomique des bactéries. Cette identification est permise grâce aux variations dans la séquence du marqueur dont le nombre s'accroît proportionnellement à la distance phylogénétique séparant le microorganisme à l'origine de la sonde et celui ciblé. Comme cela a été évoqué plus haut, ces différences de séquences sont mises à profit dans le cadre d'hybridations conduites en conditions physico-chimiques drastiques (ou « stringentes ») pour assurer la spécificité du marquage après hybridation *in situ*, les duplex non parfaitement appariés étant plus facilement déstabilisés que ceux l'étant parfaitement. La caractérisation des sondes est réalisée à l'aide d'outils bioinformatiques d'alignement de séquences tels que Blastn disponible sur la plateforme NCBI, permettant d'observer les différences de séquences entre les trois bactéries cibles. Ces séquences cibles diffèrent entre elles d'environ 20 % (cf. figure 32).

```

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

Acinetobacter   AAGGCGTAGTCGATGGGAAATTGGTTAATATTCGAATACTTCTGTGTAATGCGATGAGAG
Pseudomonas     AAAGCGTAGTCGATGGAAAACAGGTTAATATTCCTGTACTTCCAGTTATTGCGATGGAGG
Escherichia     AAGGCGTAGTCGATGGGAAACAGGTTAATATTCCTGTACTTGGTGTACTGCGAAGGGGG
** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** *

Acinetobacter   GACGGAGAAGGTTAGGTCAGCCTGGCGTTGGTTGTCCAGGTGGAAGACAGTAGGCATGCA
Pseudomonas     GACGGAGAAGGTTAGGCCAGCCTGGCGTTGGTTGTCCAGGTTTAAGGTGGTAGGCTGGAA
Escherichia     GACGGAGAAGGCTATGTTGGCCGGGCGACGGTTGTCCCGGTTTAAGCGTGTAGGCTGGTT
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** *

Acinetobacter   TCTTAGGCAAATCCGGGGTGCTCTATGCTGAGAGTCGATAGCAAGCT--AGTTTACTAGC
Pseudomonas     TCTTAGGCAAATCCGGGATTCGAAGCCGAGAGCTG-ATGACGAGTTGCCATTAGGGGAC
Escherichia     TTCCAGGCAAATCCGGAAAATCAAGGCTGAGGCGTG-ATGACGAGGCACT--ACGGTGCT
* ***** * * * * * * * * * *

Acinetobacter   GAAGTGGCTGATACCATACTTCCAAGAAAAGTCTCTAAGCTACAGTTACACAGGAATCGT
Pseudomonas     GAAGTGGTTGATGCCATGCTTCCAAGAAAAGCTCCTAAGCTTCAGATAACTGGGAACCGT
Escherichia     GAAGCAACAAATGCCCTGCTTCCAGGAAAAGCCTCTAAGCATCAGGTAACATCAAATCGT
**** * * * * * * * * * * * * * * * *

Acinetobacter   ACCCGAAACCGACACA
Pseudomonas     ACCCGAAACCGACAC-
Escherichia     ACCCGAAACCGACACA
**** *****

```

Figure 32 : Alignement de séquences multiples des domaines III, cible des sondes, des trois souches contrôle à l'aide de l'outil d'alignement multiple Clustal Omega.

La génération d'un réseau de sondes relève de la capacité de la molécule à former des repliements sur elle-même avec donc la possibilité d'une hybridation entre les différentes molécules pour former le réseau. La prédiction de la structure secondaire de la molécule à partir de la séquence est possible à l'aide d'un logiciel tel que mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>). Sur la figure 33, on observe la structure secondaire de la sonde complémentaire de la cible 23S chez la bactérie *Pseudomonas putida*, cette structure caractérisée par la plus faible valeur ΔG (-84.30 kcal/mol) étant celle ayant la plus forte probabilité parmi toutes celles possibles d'affecter le brin d'acide nucléique.

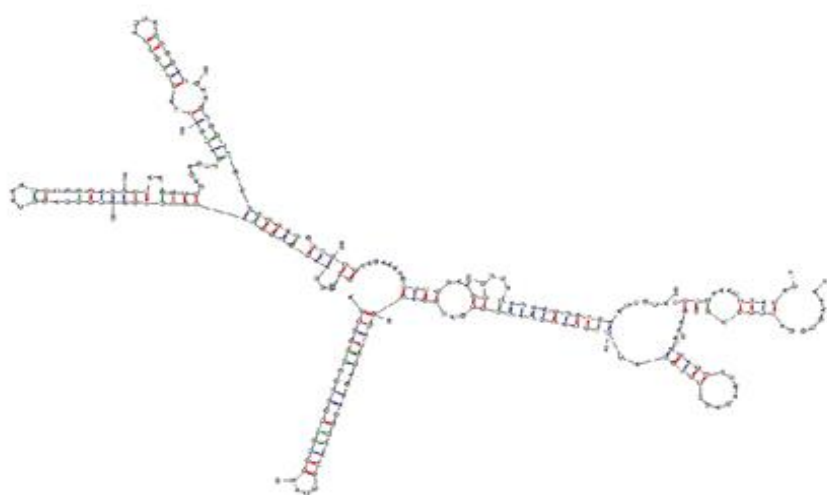


Figure 33 : Structure secondaire prédite pour la sonde 23S ciblant *Pseudomonas putida* obtenue à l'aide de mfold.

Les sondes sont dites polyribonucléotidiques, le terme caractérisant une molécule d'ARN de grande taille (256 nucléotides). Elles ont été obtenues par transcription *in vitro* d'un fragment d'ADN généré par PCR après amplification du domaine III du 23S à l'aide des amorces dégénérées 1900V et 317RT permettant d'amplifier cette cible chez un large panel de microorganismes. L'amplification intègre dans le produit PCR le promoteur de transcription nécessaire à la synthèse des sondes. Lors de la synthèse initiée par l'ARN polymérase T7, des Uraciles biotinylés sont intégrés à la séquence de la sonde ARN et permettront de créer le lien avec les fluorophores ou avec les nanoparticules magnétiques couplées à de la streptavidine afin de révéler par fluorescence ou par magnétisme les cellules positivement hybridées.

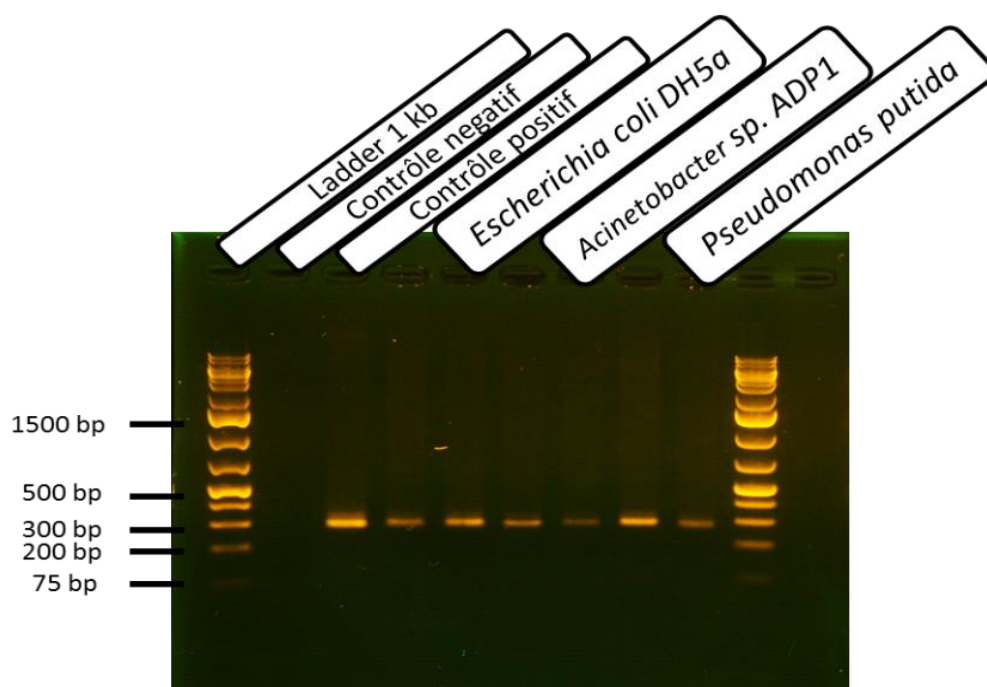


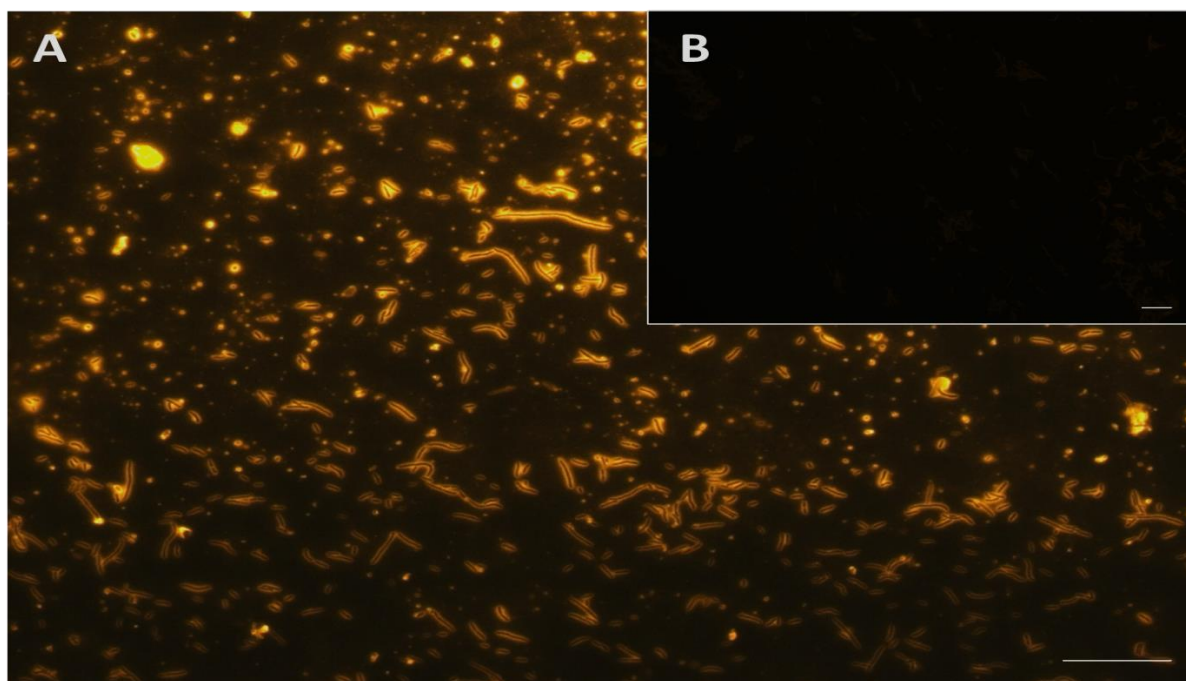
Figure 34 : Contrôle de la taille des produits PCR concernant le domaine III du gène 23S (avec deux bandes pour chaque souche). Taille théorique $\approx$ 250 pb.

1) Détermination des conditions optimales d'hybridation assurant un marquage spécifique

La spécificité d'une réaction d'hybridation est d'autant plus élevée que la déstabilisation du duplex entre sonde et cible faisant perdre le signal sera obtenue avec le plus faible nombre de mésappariements (idéalement un seul) pour des conditions dans lesquelles un appariement parfait permet l'obtention d'un signal positif. Ces conditions de très grande spécificité dépendent des paramètres physico-chimiques de l'hybridation comme cela a été explicité précédemment.

La séquence des sondes contrainte par celle des cibles et par la nécessité de former un réseau complexe ainsi que leur grande taille rendent très délicate la caractérisation de conditions d'hybridation de très forte spécificité. A partir d'une base théorique dépendant de la taille et de la séquence des sondes, les conditions ne peuvent être déterminées précisément qu'expérimentalement en faisant varier les différents paramètres. Pour cela les premières expérimentations ont été réalisées pour des questions de simplicité de lecture du résultat avec un marquage fluorescent des sondes (par ajout de streptavidine couplée à un fluorophore post

hybridation (ZyMAX™ Streptavidin-Cy3 Conjugated - Invitrogen). Le marquage fluorescent (favorisé par la création du réseau) permet également d'apprécier plus aisément (par la décroissance de l'intensité du signal de fluorescence) la déstabilisation d'un duplex parfait lors du passage à des conditions physico-chimiques de « stringence » au-delà de l'optimum. La figure 35 montre l'efficacité de l'observation des signaux de fluorescence pour déterminer expérimentalement les conditions physico-chimiques de l'hybridation par rapport au magnétisme dont les résultats sont plus difficilement exploitables dans ces étapes de contrôle.



Barre d'échelle = 10µm

Figure 35 : Exemple d'observations réalisées par microscopie à épifluorescence (objectif x 50) après un marquage avec des sondes polyribonucléotidiques (A) et contrôle sans sonde (B).

Lors d'une hybridation avec des sondes polyribonucléotidiques, un halo de fluorescence caractéristique est observable sur les échantillons marqués.

La mise au point de conditions d'hybridation compatibles avec le marquage spécifique des souches bactériennes utilisées a été réalisée en faisant varier la température (de 53 à 68 °C) et la concentration en formamide (de 60 à 95 %). La gamme large de valeurs testées, basées sur des données de la littérature [170,172,183], tient au fait de la nature polynucléotidique des sondes utilisées dont les valeurs de Tm des duplex sont plus variables que celles caractérisant les duplex formés avec des sondes oligonucléotidiques.

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent le niveau de spécificité obtenu après hybridation des génomes des 3 souches bactériennes avec la sonde complémentaire de l'ARN ribosomique de *Pseudomonas putida*. Pour toutes les conditions physico-chimiques testées, un signal d'hybridation positif a été observé sur les cellules de *Pseudomonas putida*, indiquant la compatibilité de ces conditions même si l'intensité de marquage était légèrement plus faible pour les conditions d'hybridation les plus « stringentes » (cf. figure 36), montrant leur proximité avec les limites de compatibilité. Afin de garder la meilleure sensibilité à la technique, ces conditions limites devront préférentiellement être évitées si celles plus modérées assurent encore la déstabilisation des duplex non parfaitement appariés. Pour la sonde *Pseudomonas putida*, les marquages sur *Escherichia coli* ainsi que *Acinetobacter* sp. ADP1 montrent que lorsque la température d'hybridation est trop faible (53 °C), l'augmentation de la concentration en formamide dans les tampons d'hybridation n'impacte pas le processus d'hybridation qui demeure aspécifique avec un signal de marquage positif pour les deux souches. Il faut au minimum 58 °C pour *Escherichia coli* et 60 °C pour *Acinetobacter* pour obtenir les premiers marquages négatifs (donc spécifiques) à l'aide d'un tampon d'hybridation très concentré en formamide (respectivement 95 et 90 %). On remarquera aussi que l'augmentation progressive de la température d'hybridation permet une réduction progressive de la quantité minimale de formamide à ajouter à la réaction d'hybridation pour chacune des deux souches contrôle pour atteindre un minimum de 70 % de formamide nécessaire lors d'un marquage à 68 °C.

Cible		<i>Escherichia coli</i> DH5a					<i>Acinetobacter sp.</i> APD1				
	[F]	60%	70%	80%	90%	95%	60%	70%	80%	90%	95%
T°C											
53											
58											
60											
62											
64											
66											
68											

 Signal positif
 Signal négatif

Tableau 4 : Résumé des résultats du marquage fluorescent de la sonde *Pseudomonas putida* sur les deux autres souches contrôles.

L'augmentation de la stringence de l'hybridation (Température et/ou formamide) permet une perte du signal d'hybridation sur les bactéries non cibles de la sonde.

Sonde		<i>Pseudomonas putida</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>Acinetobacter ADP1</i>				
	[F]	60%	70%	80%	90%	95%	60%	70%	80%	90%	95%	60%	70%	80%	90%	95%
T°C																
53																
58																
60																
62																
64																
66																
68																

 Marquage non spécifique
 Marquage spécifique

Tableau 5 : Résumé des résultats obtenus par hybridation in situ fluorescente avec les sondes polyribonucléotidiques.

Les travaux d'hybridation réalisés avec les 2 autres sondes (*E.coli* et *Acinetobacter*) montrent que la spécificité a pu être obtenue pour des conditions incluant une température de 60 °C pour une concentration de formamide de 80 % (cf. tableau 4). Le recours à des concentrations de formamide plus faibles (60 et 70 %) requiert un accroissement de la température d'hybridation au minimum à 66 °C pour maintenir le même niveau de spécificité qui pourrait alors s'avérer délétère pour l'état de la cellule hybridée.

Toutefois, la quantité de formamide influe aussi sur la qualité du signal de l'hybridation. On observe une baisse du niveau de fluorescence pour les concentrations de formamide supérieures à 80 % (cf. figure 36). En conclusion, les conditions optimales d'hybridation établies expérimentalement pour la sonde *Pseudomonas putida* se situent entre 64 et 66 °C pour un tampon d'hybridation contenant 80 % de formamide. Ces conditions assurent un signal d'hybridation positif (forte fluorescence) des cellules de *Pseudomonas putida* (contrôle positif) et négatif pour les 2 autres souches bactériennes, *Escherichia coli* et *Acinetobacter sp.* APD1. Pour les 2 autres sondes complémentaires des génomes d'*Escherichia coli* et d'*Acinetobacter sp.* APD1, des résultats avec le même niveau de spécificité (signal positif pour les contrôles positifs et négatifs dans les 2 autres cas) ont été obtenus pour une température d'hybridation de 60 °C conduite en présence de 80 % de formamide.

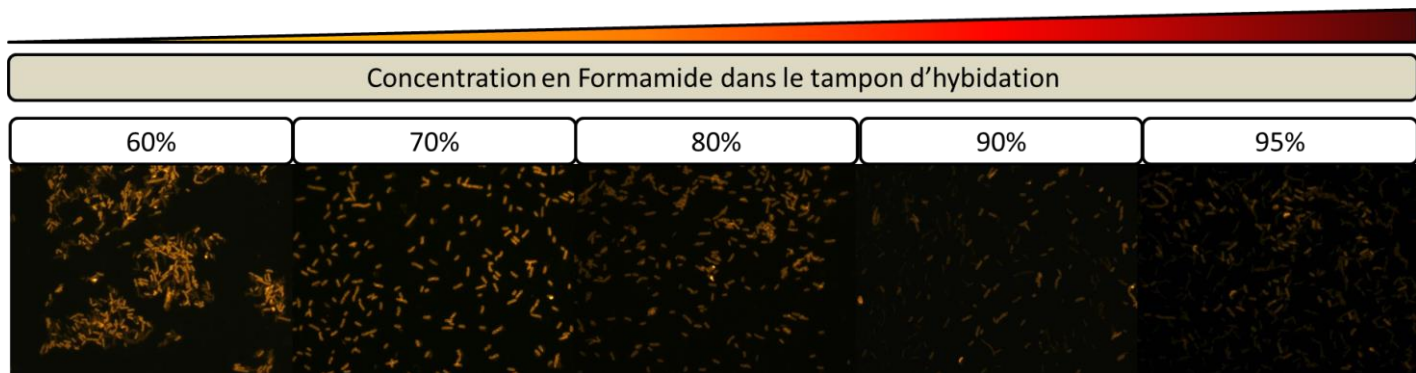


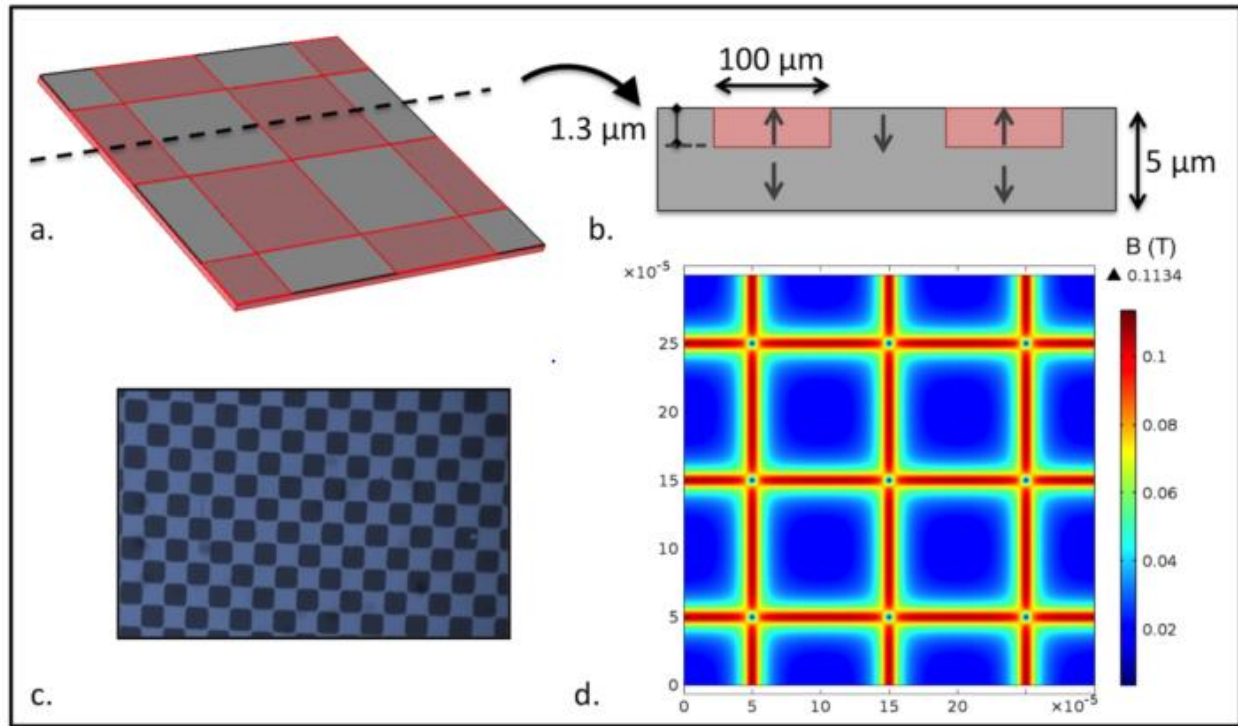
Figure 36 : Observation de la diminution de la fluorescence constatée sur des cellules de *Pseudomonas putida* marquées avec leur sonde lors de l'utilisation d'un tampon d'hybridation de plus en plus concentré en formamide.

2) Hybridation *in situ* magnétique

La série d'hybridations réalisées en utilisant la fluorescence pour révéler les duplex a permis d'identifier les conditions physico-chimiques d'hybridation qui assurent sa spécificité pour chacune des sondes utilisées. Ces conditions ont dans un second temps été utilisées dans le cadre des expérimentations dans lesquelles la détection des duplex se fait sur la base des propriétés magnétiques des nanoparticules liées aux sondes, à savoir l'attraction des cellules marquées sur un réseau de micro-aimants dans un système microfluidique permettant le tri entre cellules marquées et non marquées. L'objectif était de confirmer que le marquage des sondes par les nanoparticules ne modifiait pas les propriétés physico-chimiques de l'ADN et donc l'appariement des bases et la stabilité des duplex. Ces hybridations ont été réalisées dans des tampons d'hybridation contenant de 80 à 90 % de formamide pour des températures supérieures à 60 °C.

La stabilité des nanoparticules magnétiques est un point critique du marquage des bactéries car, lorsque la solution de nanoparticules se dégrade, des phénomènes d'adsorption aspécifique peuvent être observés. Chaque expérimentation a donc été accompagnée de la préparation d'échantillons témoins soumis aux mêmes traitements chimiques (fixation) que le reste des échantillons et incubés avec des nanoparticules magnétiques.

Le contrôle de l'hybridation magnétique a été réalisé visuellement par observation en microscopie à épifluorescence d'un réseau de micro-aimants de dimensions 100 µm x 100 µm ou 50 µm x 50 µm (motif de type damier) fourni par l'Institut Néel, sur lequel avaient été déposées les suspensions bactériennes ayant subi l'hybridation. L'observation des cellules a nécessité l'ajout aux échantillons d'une goutte de solution de bromure d'éthidium, un intercalant fluorescent de l'ADN bactérien. Un signal positif d'hybridation se manifeste par la disposition des cellules en carré, suite au déplacement des cellules entraînées par les nanoparticules vers les zones d'intensité de champ maximale. Ces zones se situent à la frontière entre deux zones d'aimantation opposées, comme le montre la figure 37. Ce positionnement conditionné par la géométrie des aimants résulte d'une hybridation positive entre sondes et cibles alors que les cellules chez lesquelles le duplex a été déstabilisé (hybridation négative) se disposeront aléatoirement à la surface du réseau d'aimants (cf. figure 38).



D'après [224].

Figure 37 : (a) Représentation schématique du réseau de micro-aimants. (b) vue en coupe montrant l'orientation de l'aimantation dans le réseau en damier. La profondeur de la zone sur laquelle l'aimantation est renversée est estimée à 1.3 μm . (c) photographie du damier (100 $\times$ 100 μm) révélée par observation en MOIF. (d) Simulation de la densité de flux magnétique B (T) dans un plan situé 4 μm au-dessus de la surface du film magnétique.

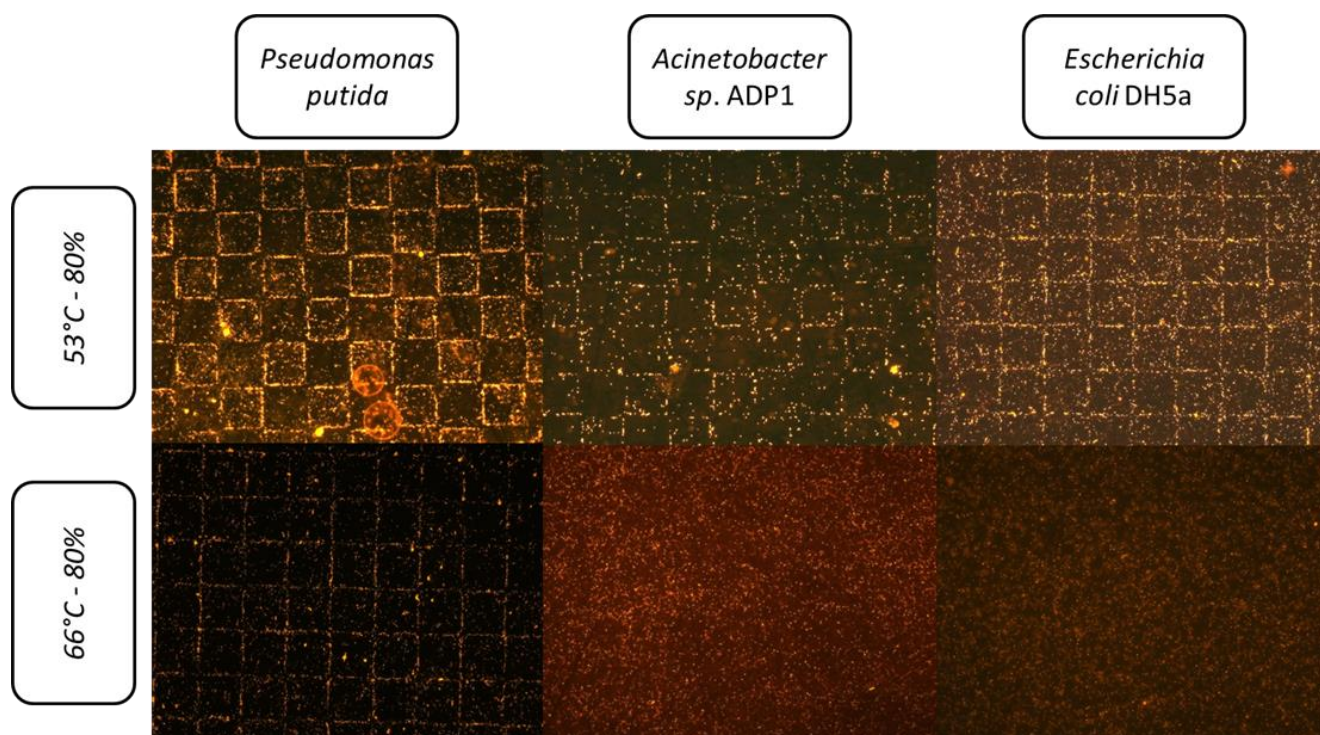


Figure 38 : Résultats obtenus pour des hybridations avec la sonde *Pseudomonas putida* sur les 3 souches contrôle à 53 °C et 66 °C pour un tampon d'hybridation contenant 80 % de formamide.

Lorsque les trois souches sont mises en présence de la sonde ciblant *Pseudomonas putida* dans des conditions peu « stringentes » à 53 °C, un signal positif de marquage (observation des carrés) est constaté. Cependant, lorsque des conditions d'hybridation « stringentes » sont utilisées (66 °C) seules les *Pseudomonas* présentent un résultat positif à l'hybridation magnétique.

Sonde		P. putida				A. ADP1				Escherichia coli			
% formamide		80%	90%	80%	90%	80%	90%	80%	90%	80%	90%	80%	90%
Temperature (°C)	53												
	58												
	60												
	62												
	64												
	66												
	68												
Cible		Escherichia coli		A. ADP1		Escherichia coli		P. putida		P. putida		A. ADP1	
	Marquage Magnétique												
	Pas de Marquage Magnétique												

Tableau 6 : Résumé des résultats obtenus en hybridation in situ magnétique.

Une série d'expérimentations a alors été réalisée afin de déterminer/contrôler les conditions d'hybridation pour chacune des combinaisons sondes-cibles, l'observation d'un dessin géométrique en carré formé par les cellules sur les aimants étant interprétée comme un résultat positif d'hybridation alors que leur dispersion aléatoire témoigne d'une hybridation négative. Il est intéressant de noter que les duplex formés par la correspondance parfaite sonde-cible ont systématiquement été détectés par un signal d'hybridation positif sur les aimants alors que les duplex hétérologues étaient déstabilisés et produisaient un signal d'hybridation négatif, témoignant de la spécificité de l'hybridation générée par les conditions physico-chimiques utilisées (cf. tableaux 5 et 6). De façon assez surprenante, des conditions d'hybridation ménagées (53 °C et 80 % de formamide) assurent la spécificité de la sonde ciblant *Escherichia coli* contre la souche *Acinetobacter sp.* ADP1 (déstabilisation des duplex et donc hybridation négative détectée sur le réseau d'aimants) confirmant des résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire [172].

Des aliquotes des suspensions de bactéries après l'étape d'hybridation et de marquage magnétique ont été utilisées pour réaliser des observations en microscopie électronique à transmission. L'observation des photographies réalisées dans les conditions d'hybridation où des résultats positifs ont été observés sur les aimants (disposition des cellules selon la géométrie des aimants et absence d'adsorption aspécifique) montre clairement la localisation des nanoparticules magnétiques au niveau de la périphérie de la cellule (cf. figure 39). Ces résultats confirment que les sondes se sont effectivement hybridées sur les ARN à l'intérieur de la cellule et que le réseau de sondes formé à l'extérieur de la cellule a permis l'attachement d'un nombre suffisant de nanoparticules pour permettre l'attraction des cellules sur les régions des aimants où les forces magnétiques étaient les plus importantes.

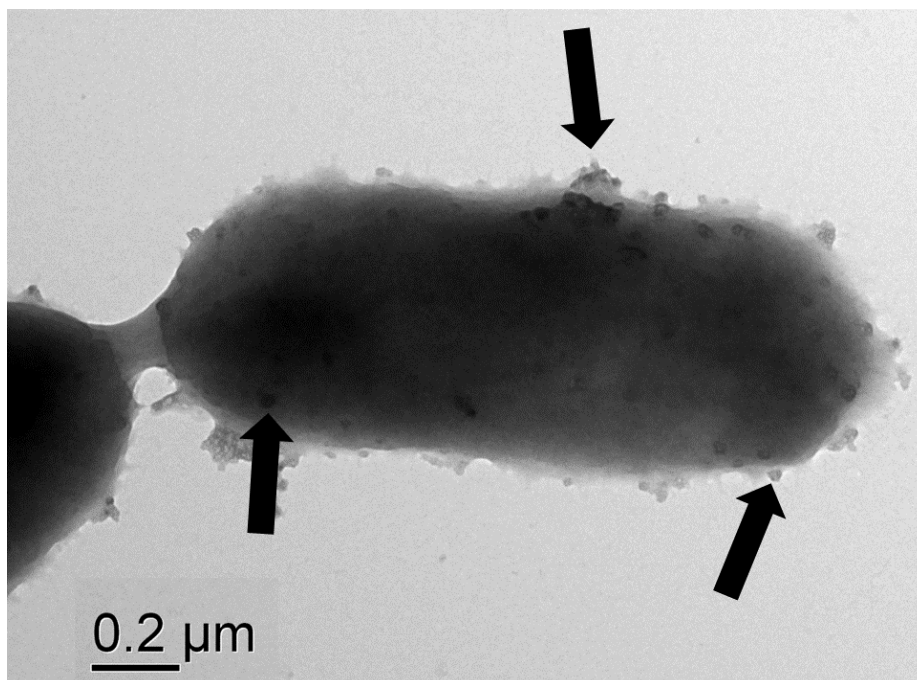


Figure 39 : Observation en microscopie électronique à balayage d'une bactérie Escherichia coli marquée par MISH (53 °C 8 0% formamide) (flèche noire = nanoparticule magnétique de 50 nm)

L'objectif de ce travail de thèse est le développement d'une approche méthodologique permettant la capture de cellules bactériennes spécifiques au sein d'un échantillon composé d'une grande diversité de populations différentes. Nous avons montré jusqu'ici l'intérêt en termes de sensibilité et de spécificité de l'approche MISH basée sur un marquage magnétique de cellules bactériennes caractérisées taxonomiquement lors d'une étape préalable d'hybridation *in situ* ciblant des régions variables de l'ARNr 23S. Ces travaux ont été réalisés sur des cellules de bactéries cultivées *in vitro*. Ils ont permis de définir pour chacune de ces 3 populations des sondes et les conditions d'hybridation permettant d'atteindre le meilleur niveau de spécificité et de sensibilité lors d'expérimentations en systèmes simplifiés n'incluant aucun mélange de souches. Les travaux que nous présentons dans cette partie abordent l'étape suivante qui est d'évaluer à la fois la capacité de chacune des sondes à marquer spécifiquement les cellules ciblées par la séquence et celle des systèmes de tri à pouvoir séparer les cellules marquées (hybridation positive) de celles qui ne le sont pas (hybridation négative consécutive à une déstabilisation des duplex du fait de mésappariements entre sondes et cibles).

3) Expériences de capture sur microsysteme

Le tri est réalisé en faisant passer les échantillons dans le microcanal du dispositif avec un débit faible (1µl/minute), de façon à permettre aux bactéries marquées magnétiquement de s'accrocher au fond du canal sous l'action du champ magnétique généré par les micro-aimants. Les cellules non hybridées continueront leur trajet dans le microcanal et pourront être récupérées spécifiquement. Après rinçage dans les mêmes conditions de débit, un accroissement du débit (100µl/min) suffit à décrocher les cellules marquées par les nanoparticules magnétiques de leur support. Celles-ci peuvent ainsi être récupérées séparément des bactéries non marquées.

L'objectif de nos travaux est d'évaluer la spécificité et la sensibilité quand sont traitées et hybridées avec chacune des sondes caractérisées des suspensions bactériennes. A cette fin seront étudiées qualitativement et quantitativement par PCR quantitative le contenu des fractions d'entrée (suspensions initiales), des fractions négatives (suspensions correspondant aux bactéries non marquées magnétiquement éliminées sous flux lent (1µl/minute)) et les fractions positives (suspensions correspondant aux bactéries marquées magnétiquement, retenues sur les aimants sous flux lent (1µl/minute) mais décrochées par l'accroissement du débit à 100µl/min).

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage (cf. figure 40), où la valeur du 100 % a été assignée à la valeur obtenue pour la fraction d'entrée correspondant à la suspension bactérienne qui n'est pas passée dans le dispositif magnétique. De manière générale, on remarquera que le nombre cumulé de cellules dans les fractions négatives et positives est supérieur à 90 % de celui de la fraction d'entrée, témoignant ainsi du faible niveau de pertes de bactéries lors du passage à travers le microsysteme. A noter que certains échantillons présentent une valeur supérieure à 100 % lors de l'addition des fractions négatives et positives, phénomène pouvant être expliqué par les biais inhérents à la méthode qui n'empêchent cependant pas d'observer des tendances claires.

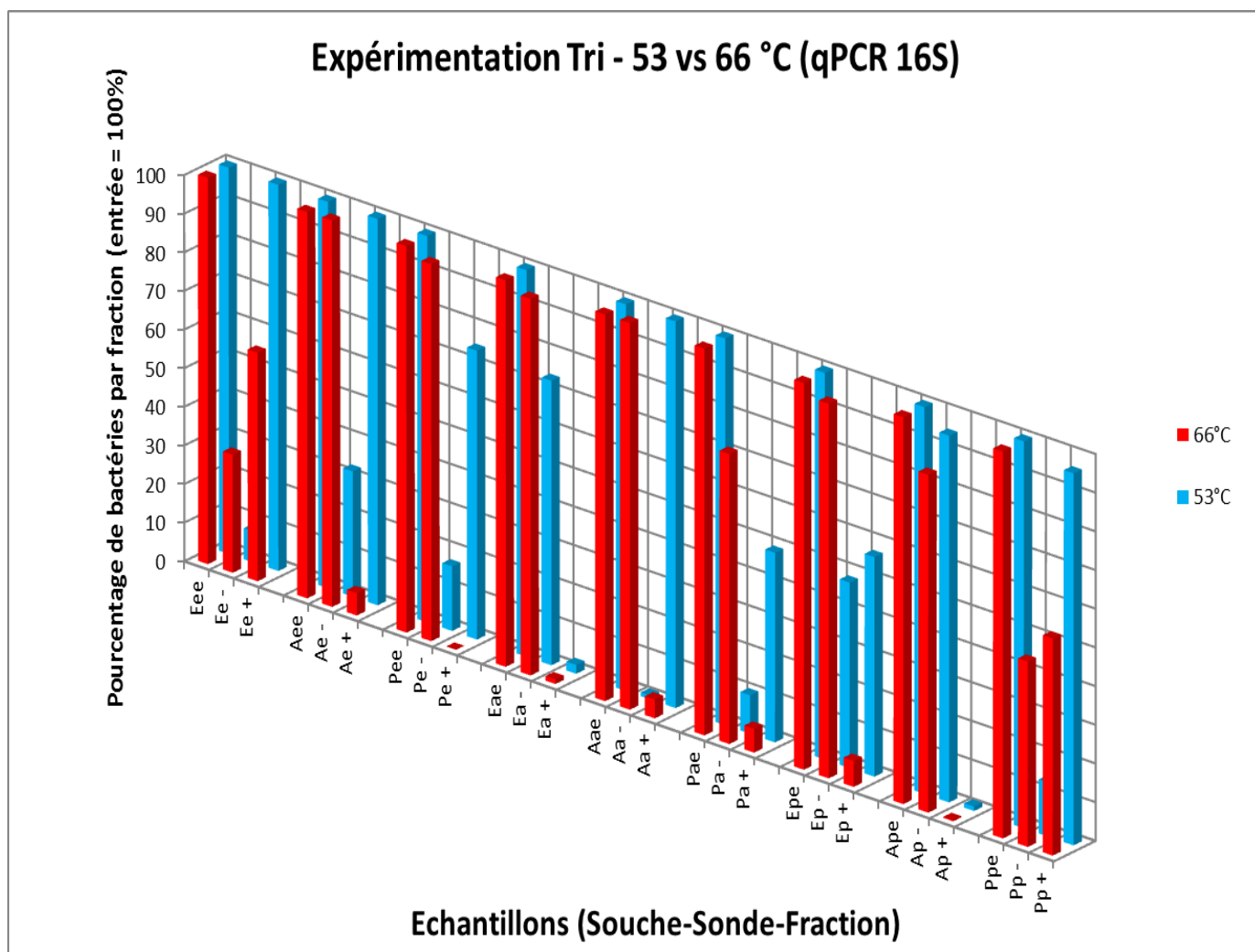


Figure 40 : Comparatif des données obtenues en qPCR sur le gène 16S pour les différentes fractions après marquage à 53 ou 66 °C et récupération des fractions magnétiques (+) et non magnétiques (-) par utilisation d'un microsystème magnétique.

- **Sonde *Pseudomonas putida***

Les marquages réalisés avec la sonde dirigée contre *Pseudomonas putida* ont produit les résultats suivants : Lorsque le marquage était réalisé sur *E.coli* avec des conditions d'hybridation peu « stringentes » (53 °C), la fraction magnétique était plus concentrée (56 %) que la fraction négative (48 %), tendance complètement inversée lorsque la sonde était utilisée dans des conditions « stringentes » avec 96 % des cellules dans la fraction non magnétique contre 6 % de cellules dans la fraction magnétique. Pour un marquage d'*Acinetobacter*, les résultats étaient similaires quelles que soient les conditions d'hybridation utilisées avec une fraction magnétique quasi nulle (1 et 0.5 %) et une fraction négative très majoritaire (88 et 95 %). Finalement, lors

d'une hybridation avec sa souche cible, *Pseudomonas putida*, 81 % des cellules étaient présentes dans la fraction magnétique pour une hybridation à 53 °C contre 56 % pour un marquage à 66 °C.

La sonde *Pseudomonas putida* apparaît très spécifique de sa souche cible, permettant dans des conditions d'hybridation suffisamment « stringentes » de ne réaliser la capture magnétique que de bactéries présentant une totale similarité de séquences de la région ciblée par la sonde. Il sera aussi intéressant de noter que l'augmentation de la « stringence » du marquage a aussi un effet négatif sur la sensibilité du marquage, comme en témoigne la diminution des fractions magnétiques entre 53 et 66 °C dans le cas de ces expérimentations avec *Pseudomonas putida*.

- **Sonde *Acinetobacter* sp. ADP1**

Lors de l'utilisation de la sonde *Acinetobacter* sp. ADP1 sur la souche *Pseudomonas putida*, on observe une fraction magnétique très concentrée (87 %) lors d'une hybridation à 53 °C qui deviendra à l'opposé très faible (< 2.5 %) lors de l'utilisation de conditions d'hybridation plus « stringentes ». Pour *Escherichia coli*, quelles que soient les conditions testées, la fraction magnétique récoltée est aussi très minoritaire (<1 %), témoignant de l'absence de marquage aspécifique même pour des températures d'hybridation de 53 °C, confirmant des résultats précédents du laboratoire [172]. Dans le cas particulier d'*Acinetobacter*, l'augmentation de la température d'hybridation a eu un effet négatif sur le marquage où la fraction magnétique passe de 100 % pour une hybridation à 53 °C à 4 % lorsque l'hybridation est réalisée à 66 °C. L'augmentation de la température a bien l'effet répressur de l'hybridation sur les espèces non cibles, mais occasionne également la perte de l'hybridation sur les cellules de la souche cible (<5 %). Les conditions d'hybridation seraient trop « stringentes », nécessitant d'autres étapes expérimentales afin d'atteindre des conditions optimales d'hybridation.

- **Sonde *Escherichia coli***

La sonde *Escherichia coli*, lorsqu'elle est utilisée avec la souche *Pseudomonas putida* permet d'obtenir une fraction magnétique riche (75 %) pour une hybridation à 53 °C et qui deviendra nulle après augmentation de la température d'hybridation (66 °C). Lorsqu'utilisée avec la souche *Acinetobacter* sp. ADP1, la fraction magnétique passe de 75 % à 1 %, quand la température d'hybridation passe de 53 à 66 °C. De manière assez surprenante ces résultats ne sont pas totalement en accord avec les précédent travaux réalisés dans le laboratoire où un marquage

magnétique spécifique avait été obtenu dès 53 °C avec la sonde *E.coli* contre *Acinetobacter* sp.ADP1 [172].

Finalement, lors d'une hybridation sur sa souche cible, *Escherichia coli*, cette sonde capture près de 100 % des cellules présentes dans la fraction magnétique pour une hybridation à 53 °C contre 59 % pour un marquage à 66 °C, illustrant une nouvelle fois l'impact des conditions d'hybridation sur la qualité du marquage qui perd en sensibilité lors de conditions d'hybridation plus « stringentes ».

Nous avons au cours des expérimentations menées avec les sondes polyribonucléotidiques tenté d'illustrer le potentiel de ces sondes pour un marquage magnétique spécifique de bactéries. Ces expérimentations s'appuient sur le concept de « *probe based cell –fishing* » [170] basé sur l'utilisation de sondes de longue taille dotées aussi d'une possibilité d'hybridation croisée inter-sondes conduisant à la formation d'un réseau complexe de sondes [183]. Ce réseau de sondes va générer un signal d'hybridation fluorescent caractéristique et concentré au niveau de la périphérie de la cellule [142] lié à une accumulation de sondes au niveau de la paroi bactérienne. Ce réseau peut aussi être utilisé afin de greffer sur une bactérie des nanoparticules magnétiques qui restent trop volumineuses pour pénétrer à l'intérieur d'une cellule bactérienne.

Ces premières expérimentations ont été menées dans le but de contrôler le bon fonctionnement du marquage en utilisant les sondes ciblant le domaine III de l'ARNr 23S et de vérifier qu'il est bel est bien possible de réaliser un marquage spécifique en faisant varier les conditions physico-chimiques de l'hybridation. En modifiant température d'hybridation et quantité de formamide présente dans le tampon d'hybridation, il a été possible d'identifier des conditions d'hybridation optimales (66 °C et 80 % de formamide). Ces conditions peuvent paraître drastiques en comparaison de celles utilisées pour des sondes courtes. Elles sont cependant en agrément avec celles décrites dans la littérature [170] rapportant un tampon d'hybridation contenant 95 % de formamide et une température d'hybridation de 58 °C comme conditions optimales de la capture de cellules de *Burkholderia* avec des taux de récupération de cellules cibles dans la fraction magnétique de plus de 90 %.

Les résultats des tris illustrent le potentiel du MISH pour le marquage et la capture magnétique de bactéries à l'aide des sondes ciblant *Pseudomonas putida* et *Escherichia coli* lorsque les conditions d'hybridation sont adaptées (« stringentes »). En dehors des *Escherichia coli* et d'*Acinetobacter* hybridées respectivement avec les sondes ciblant *Acinetobacter sp. ADP1* et *Pseudomonas putida*, l'hybridation avec des conditions peu « stringentes » ne permet pas de réaliser une capture sélective de bactéries, ce qui indique que le niveau de spécificité pour une hybridation à 53 °C reste trop faible pour espérer réaliser un enrichissement à partir d'un échantillon complexe. Les fractions magnétiques récoltées de manière générale sont toujours moins importantes lors d'un marquage à 66 °C, illustrant aussi l'importance d'un bon équilibre en termes de « stringence » des hybridations au risque de perdre tout marquage à l'image des résultats obtenus avec la sonde *Acinetobacter sp. ADP1* à 66 °C.

En dépit de ces premiers résultats prometteurs, il convient cependant aussi de citer quelques limitations liées à l'utilisation de ces sondes notamment celles liées à leur production basée sur l'amplification PCR et la transcription *in vitro*. En effet, ces étapes ne peuvent être réalisées que sur l'ADN extrait d'isolats bactériens (donc limités). Par ailleurs la caractérisation des sondes s'avèrera beaucoup plus délicate si des gènes fonctionnels sont ultérieurement ciblés alors que les amorces PCR utilisées pour la préparation de la matrice de transcription des sondes 23S présentent l'avantage d'être, au moins en théorie, utilisables avec toutes les bactéries. Pour chaque gène fonctionnel, de nouveaux couples d'amorces devront être définis, l'unique exemple à ce jour étant celles ciblant le gène *nirK* pour réaliser un enrichissement en bactéries correspondantes dans des boues activées [163].

Afin de passer outre les biais présentés ici, il semblait intéressant de travailler, en parallèle, sur le développement d'une autre approche de marquage, potentiellement plus simple à mettre en place et plus flexible. Il était donc nécessaire d'identifier une méthode permettant un panel plus large de cibles d'hybridation mais dont la structure ne serait pas problématique pour son adaptation à de nouvelles cibles. L'hybridation en chaîne ou HCR répondait à ces critères mais sa potentielle application au marquage magnétique n'avait encore pas été démontrée, ce qui justifie les travaux présentés dans la partie suivante.

C. Hybridation en chaîne ou HCR

1) Expériences initiales

Avant toute application en marquage magnétique, la première étape du travail a consisté à vérifier la capacité de l'approche HCR à amplifier un signal d'hybridation. A cette fin, la sonde Eub338 (dite universelle car complémentaire d'une région de l'ARN ribosomique hautement conservée chez toutes les bactéries) a été sélectionnée et utilisée contre une souche *Escherichia coli* K12. Comme précédemment, la technique a été développée avec la fluorescence comme outil de détection des hybridations en accord avec le protocole défini par Yamaguchi [226]. Nos travaux ont inclus une large série d'expériences contrôles dont les résultats sont présentés dans la figure 43. En présence de tous les éléments de la réaction, incluant la sonde initiatrice et les sondes H1 et H2 biotinylées, le respect du protocole présenté en M&M (cf. tableau 3 & figure 42) aboutit au marquage par fluorescence des cellules *E.coli* (ligne 4). Le retrait des amplificateurs tout en conservant la sonde initiatrice couplée à des biotines (ligne 1) entraîne une perte de signal de fluorescence indiquant que l'assemblage des sondes H1 et H2 permet bien une amplification du signal. L'utilisation d'une sonde EUB338 tronquée de sa fraction initiatrice servant à la fixation par chevauchement en chaîne des 2 sondes amplificatrices ne produit également, comme attendu, aucun signal fluorescent d'hybridation (ligne 2), puisque le réseau de sondes hybridées ne peut se lier à la sonde (EUB338) hybridée sur le matériel de la cellule. Le fait de ne pas « biotinyler » les sondes amplificatrices (ligne 3) compromettant ainsi la fixation des fluorophores résulte aussi en un signal de fluorescence négatif. Ce contrôle montre l'absence d'adsorption non spécifique sur la paroi des bactéries. Le retrait de la sonde amplificatrice H2 (ligne 6) aboutit à l'absence d'un signal de fluorescence en raison de l'absence d'initiation de la réaction d'amplification. En revanche, en l'absence de la sonde amplificatrice H1 (ligne 5), un signal de fluorescence plus faible que dans le cas d'une réaction de HCR complète (ligne 4) est observable. Cette expérience permet ainsi d'exclure une hybridation directe non spécifique des sondes amplificatrices avec le matériel nucléique de la cellule et d'illustrer le bon fonctionnement de la procédure en fluorescence.

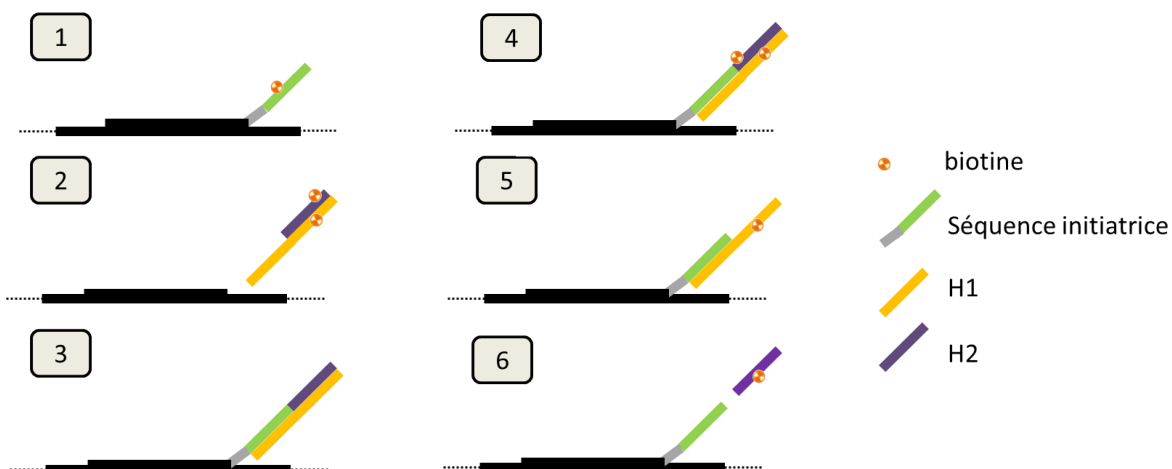


Figure 41 : Représentations schématiques des différentes conditions testées présentées dans le Tableau 3 et les figures 42 et 43.

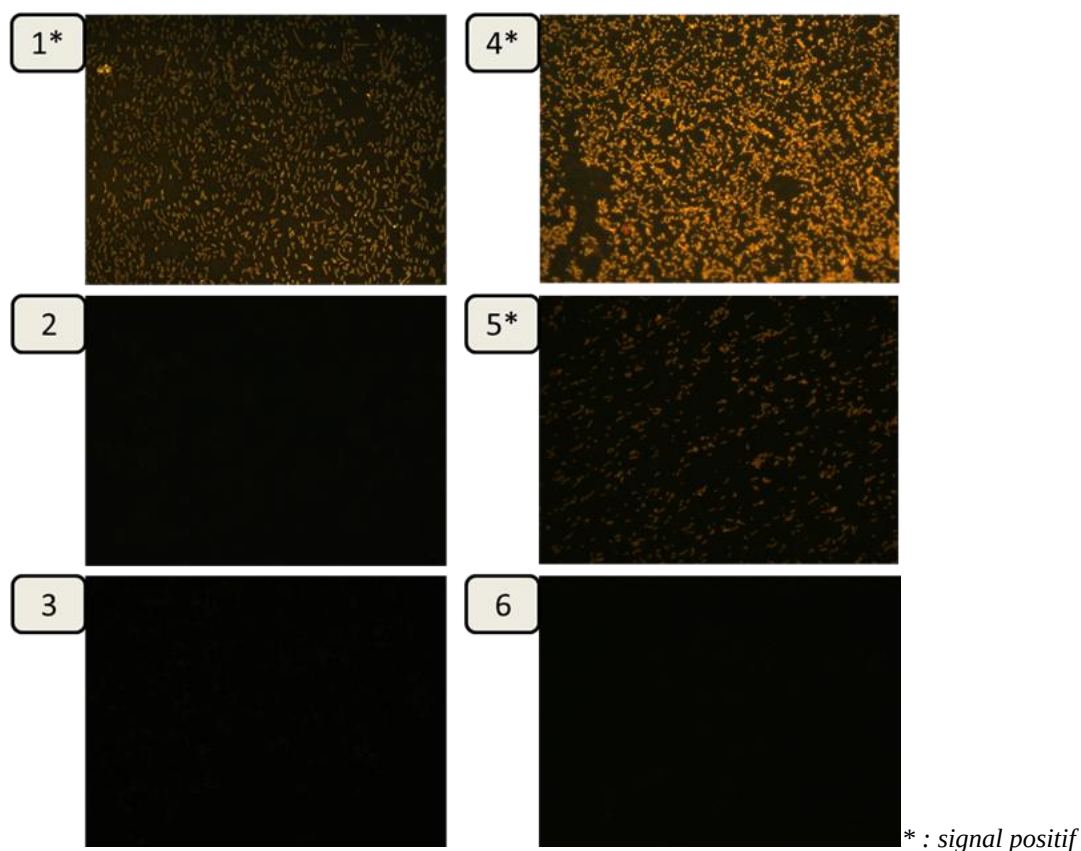


Figure 42 : Résultat d'hybridation fluorescente par HCR sur Escherichia coli avec la sonde Eub338 (Eub-I-b).

(1) : sondes Eub338 avec la partie « initiateur » biotinylée. **(2)** : sonde Eub338 sans initiateur avec les sondes amplificatrices H1 et H2. **(3)** : réaction complète de HCR mais sans biotine. **(4)** : réaction HCR complète, témoin « positif ». **(5)** : réactions HCR incomplètes avec uniquement une seule des sondes amplificatrices (H1), **(6)** : réactions HCR incomplètes avec uniquement une seule des sondes amplificatrices (H2).

Une série d'expérimentations contrôles incluant successivement les mêmes critères d'exclusion des composants de la réaction d'hybridation et d'amplification a été réalisée avec une détection magnétique du signal. Des résultats comparables ont été observés (cf. figure 44) avec un signal positif observé uniquement lorsque la totalité des éléments de la réaction étaient ajoutés (condition n°4), confirmant la nécessité de 2 sondes amplificatrices pour l'amplification du signal, de la partie initiatrice de la sonde pour la fixation du réseau amplificateur, excluant ainsi toute hybridation non spécifique des sondes amplificatrices avec ADN ou ARN de la cellule. Enfin, l'absence de signal positif (visualisation du carré fluorescent aux zones de juxtaposition des aimants) pour des sondes non biotinylées confirme la nécessité de cette liaison chimique pour fixer les nanoparticules sur les sondes et exclut toute possibilité d'adsorption non spécifique des nanoparticules sur les cellules bactériennes. L'examen des images montre toutefois que la seule sonde amplificatrice H1 (en l'absence de H2) (image n°5) se traduit par l'apparition du motif spécifique d'une attraction magnétique des cellules quoique son dessin soit beaucoup moins net qu'en présence des 2 sondes. Ce résultat peut être interprété comme la démonstration que les particules fixées sur cette seule sonde ont permis le déplacement d'un nombre significatif de cellules bactériennes, montrant une meilleure sensibilité du magnétisme par rapport à la fluorescence. Par contre, tout à fait logiquement, le maintien de la seule sonde H2 (en l'absence de H1), incapable de se lier à la sonde initiatrice ne conduit à aucun signal positif.

La HCR est une technique relativement récente qui repose sur des réactions d'hybridation en chaîne entre deux épingles d'ADN complémentaires par chevauchement, permettant d'arborer des niveaux de sensibilité très intéressants et rivalisant avec d'autres techniques de marquage fluorescent incluant une étape d'amplification du signal (ex : CARD-FISH). Les travaux sur la HCR ont été initiés en proposant l'hypothèse que la longue chaîne issue de l'assemblage des sondes amplificatrices H1 et H2 pourra être utilisée comme lien entre l'ADN intracellulaire et les nanoparticules magnétiques. Les travaux menés jusqu'alors avec la sonde Eub338 illustrent bien le potentiel de l'approche pour le marquage magnétique et ont permis d'illustrer la possibilité de réaliser un marquage magnétique de bactéries à l'aide de la technique HCR et de mettre en avant l'importance de la présence de ses trois composantes au risque de perdre toute trace de marquage magnétique.

La structure globale de la réaction de HCR comprenant trois sondes est extrêmement intéressante pour une utilisation plus large de ce type de marquage. Ce point tient de la structure particulière de la sonde initiatrice arborant une partie invariable nécessaire à l'initiation de la réaction d'amplification et une seconde partie variable qui est le point d'ancrage de cette sonde sur l'ADN/ARN cible. La structure de ces sondes n'est donc en soit qu'une simple adaptation de sondes potentiellement déjà décrites dans la littérature ou dans les bases de données dans lesquelles la séquence initiatrice sera ajoutée. Les deux sondes amplificatrices sont de leur côté deux brins d'ADN formant deux épingles dont la structure reste la même quel que soit le type de sondes initiatrices utilisées. Elles n'auront donc pas besoin d'être modifiées selon les sondes que l'on souhaite utiliser.

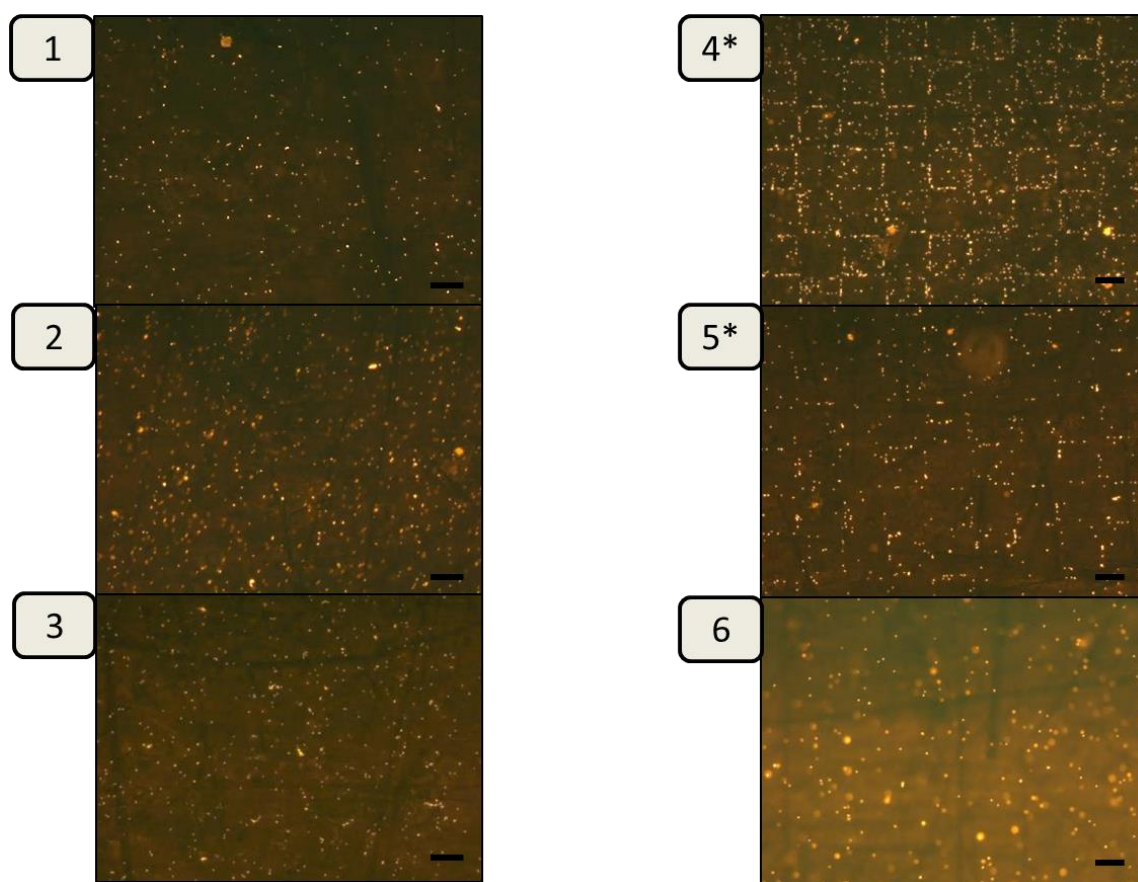


Figure 43 : Résultats d'hybridation in situ magnétique couplée à une approche HCR

Observation réalisée pour les différentes conditions d'hybridation présentées plus tôt. Sont positifs à un marquage magnétique (observation des motifs géométriques du micro aimant) les échantillons marqués d'une étoile ().*

2) Mise au point d'un marquage spécifique par HCR **(marquage fluorescent)**

La démonstration de l'intérêt de l'approche HCR et la détermination de ses propriétés ayant été réalisées, l'étape suivante a été de l'appliquer aux problématiques concernant la capture spécifique des 3 souches bactériennes sélectionnées. La première étape a consisté à caractériser des sondes nucléiques complémentaires des régions variables du gène 23S, de façon à pouvoir comparer sur une même base les résultats de HCR et de MISH. Les sondes ont été définies d'après la base de données probeBase en sélectionnant des séquences ayant déjà démontré leur potentiel pour un marquage en FISH et en les modifiant pour y insérer la séquence initiatrice nécessaire au HCR. Les sondes ACA652-I (*Acinetobacter*, 5'- CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA AAT CCT CTC CCA TAC TCT A -3'), Ppu-I (*Pseudomonas putida*, 5'- CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA AGC TGG CCT AAC CTT C -3') et ECO1167-I (*E. coli*, 5'- CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA AGC ATA AGC GTC GCT GCC G -3') ont été synthétisées et fonctionnalisées avec une biotine en 5'. La concentration en formamide ainsi que la température d'hybridation ont été définies en suivant les recommandations décrites dans la littérature [149,227] pour l'utilisation de ces sondes à savoir 48 °C comme température commune mais en présence de 20 % de formamide pour Ppu, 35 % pour ACA652 et 40 % pour ECO1167.

Les résultats présentés en figure 44 montrent un signal de fluorescence dans les 3 cas où les sondes étaient confrontées aux cellules des bactéries dont la séquence du gène 23S avait servi à les caractériser (hybridation homologue, à savoir Ppu contre *Pseudomonas putida*, ACA652-I contre *Acinetobacter* et ECO1167-I contre *E.coli*). En revanche, aucun signal de fluorescence n'a pu être observé dans le cas des hybridations hétérologues, ce qui confirme la validité de la séquence des sondes et la pertinence des conditions d'hybridation définies d'après la littérature. Ces résultats évitent le recours à des expérimentations complémentaires qui viseraient à définir d'autres conditions d'hybridation pour assurer la spécificité de la réaction d'hybridation. Il est à noter que l'ajout de la partie initiatrice dans la séquence sonde n'a pas d'impact sur la spécificité de l'hybridation puisque les résultats sont conformes à ceux obtenus lors de l'utilisation de cette sonde non assortie de sa partie initiatrice.

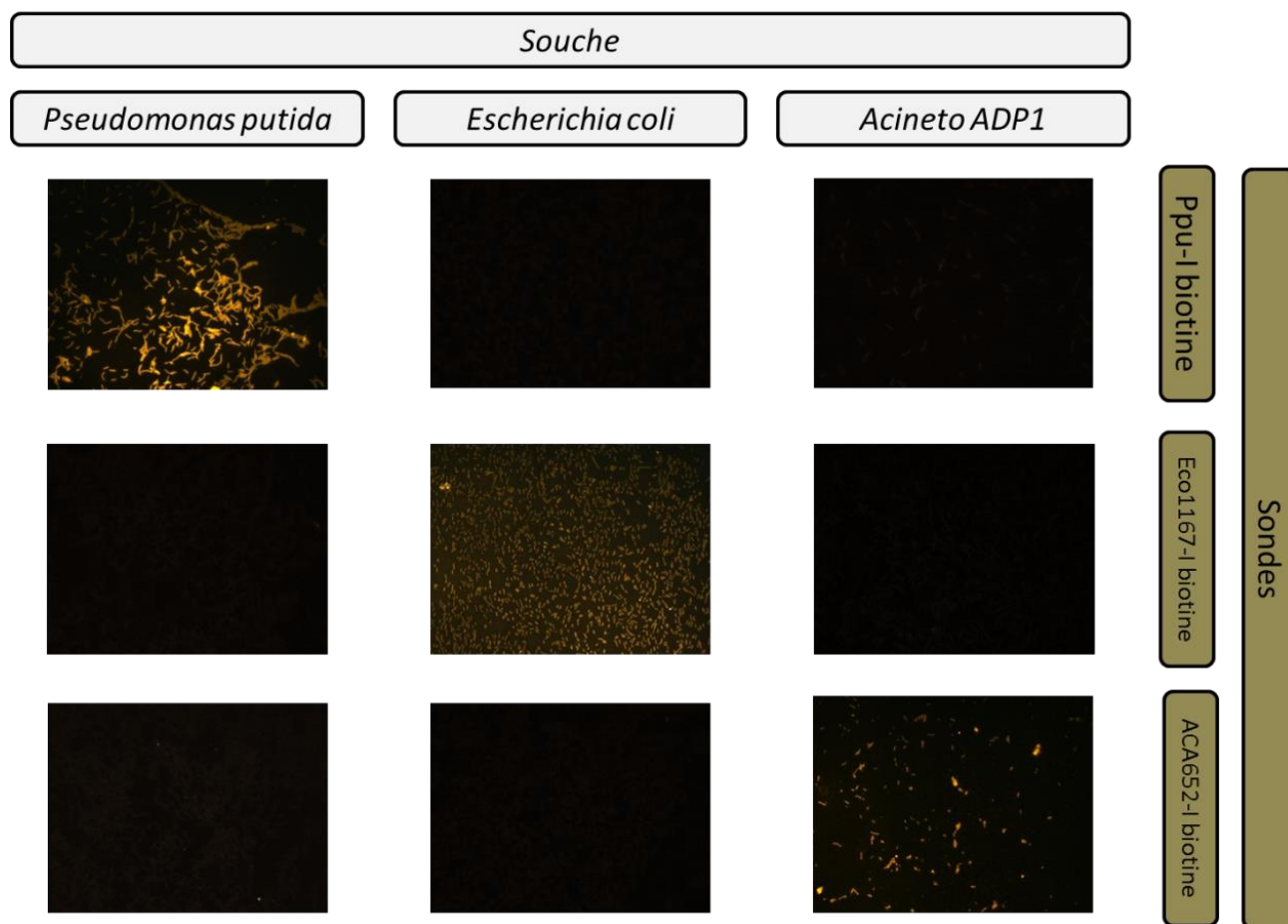


Figure 44 : Résultats d'expérimentations en FISH utilisant les sondes initiatrices modifiées Ppu, ACA652 et ECO1167. Sont positifs (signal de fluorescence) uniquement les marquages où la sonde initiatrice est utilisée avec sa souche cible

3) Confirmation de la spécificité du marquage HCR (marquage magnétique)

Les sondes 23S caractérisées et validées en fluorescence ont été utilisées pour réaliser une réaction complète de HCR couplée à un marquage magnétique selon les mêmes conditions d'hybridation que celles décrites précédemment et issues de la littérature [149,227]. Les résultats présentés en figure 45 confirment la spécificité de l'hybridation avec un résultat positif (attraction des cellules à la frontières entre zones d'aimantations opposées, dessinant des motifs carrés) uniquement dans le cas des réactions homologues (sonde et cible de la même bactérie).

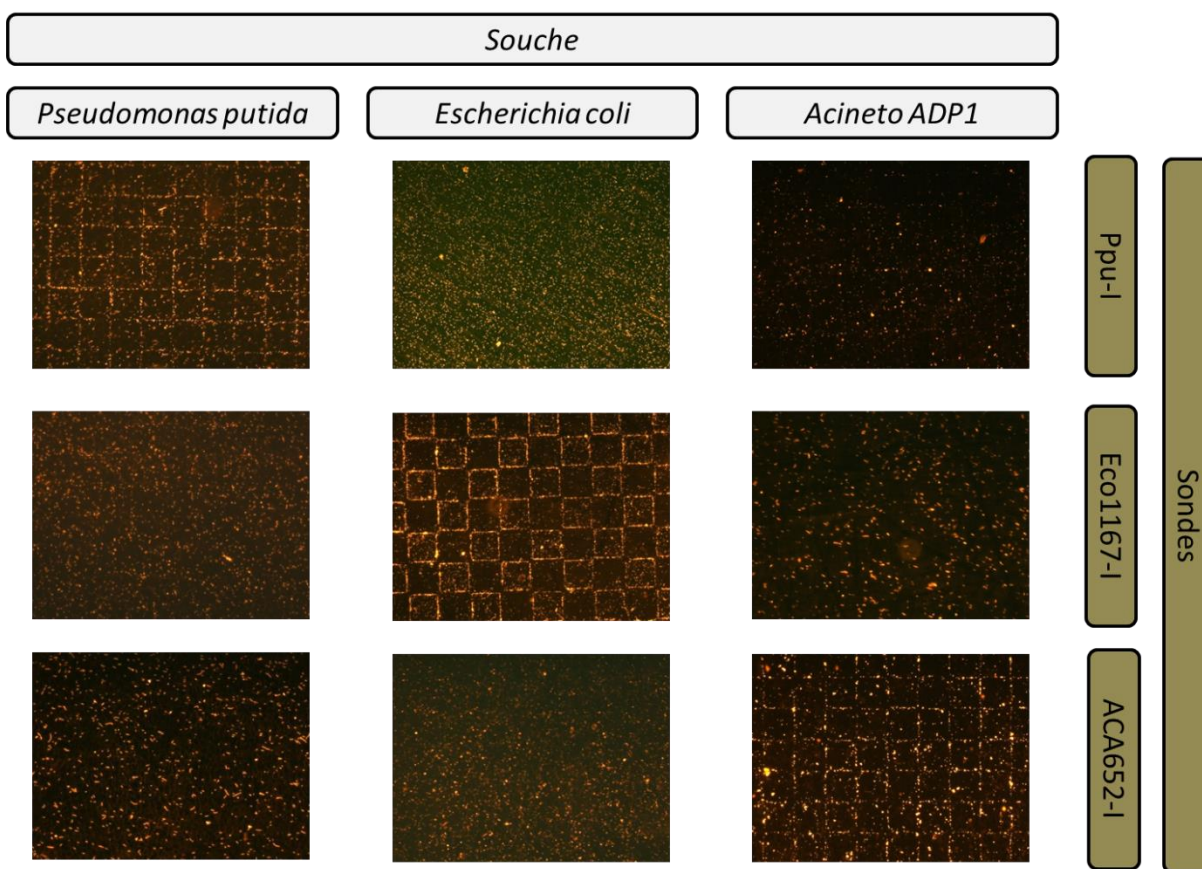
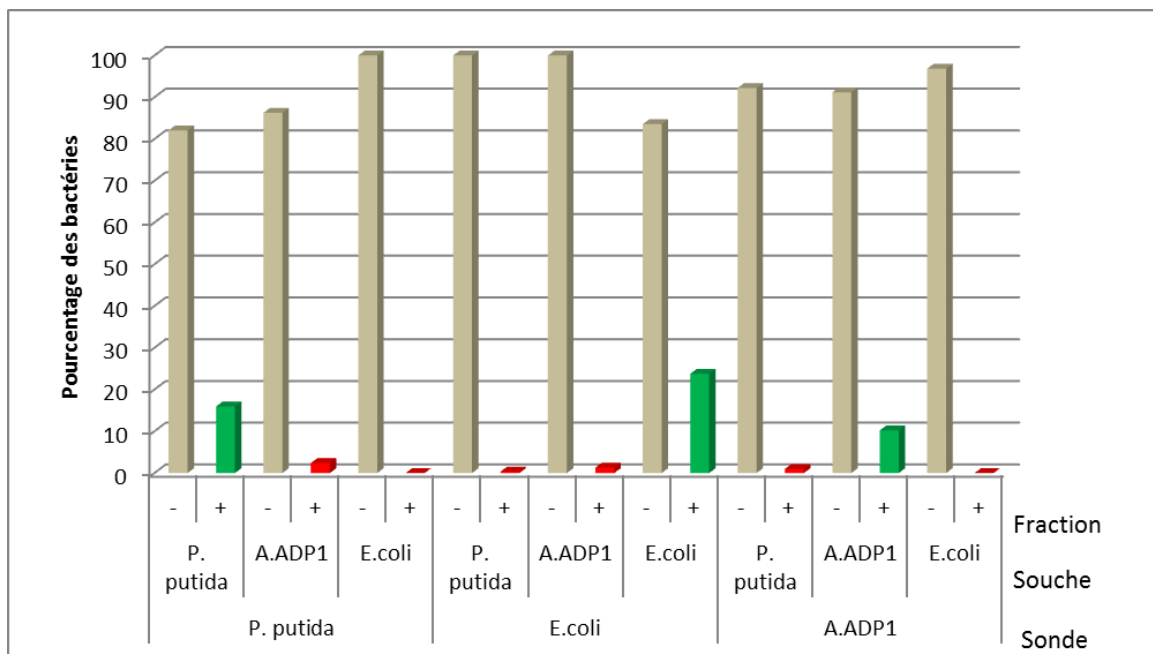


Figure 45 : Résultats d'expérimentations d'hybridation HCR magnétique en utilisant les sondes initiatrices Ppu-I, ACA652-I et Eco1167-I. Sont positifs (agencement en carré) uniquement les marquages où la sonde initiatrice est utilisée avec sa souche cible.

Des expérimentations similaires à celles réalisées avec des bactéries marquées par MISH ont aussi été entreprises dans le cadre d'un marquage HCR avec les conditions d'hybridation identifiées préalablement comme spécifiques.

Les résultats sont résumés dans la figure 46, avec les données qPCR sur les différentes fractions récoltées lors du passage des échantillons sur le microsystème magnétique. On observe pour chacune des souches, quelle que soit la sonde choisie, que la fraction négative (composée de bactéries non marquées) représente toujours une large proportion (>80 %) des bactéries initialement présentes dans l'échantillon. Les fractions magnétiques obtenues étaient à chaque fois les plus riches lorsque les sondes ECO1167 (23 % pour *E.coli* contre 1 % et 0 % pour *Acinetobacter* et *Pseudomonas*), ACA652 (10 % pour *Acinetobacter* contre moins de 1 % pour *E.coli* et *Pseudomonas*) et Ppu (16 % pour *Pseudomonas* contre 0 % et 2 % pour *E.coli* et *Acinetobacter*) étaient utilisées avec leurs cibles respectives, ce qui permettait de récupérer environ 10-20 % des bactéries présentes dans la fraction initiale, démontrant ainsi la possibilité d'utiliser le HCR pour réaliser la capture magnétique de bactéries.



Les données sont présentées en % des bactéries totales présentes dans la fraction initiale (fraction 1)

Figure 46 : Abondances des bactéries dans les fractions négatives (-) et magnétiques (+) récoltées lors des expériences de capture en utilisant l'approche HCR pour le marquage magnétique des échantillons.

Les seuls échantillons ayant permis la capture de bactéries dans la fraction magnétique correspondent aux cas d'utilisation des sondes initiatrices avec leur souche cible.

D. Comparaison MISH/HCR

Nous avons montré que le MISH ainsi que l'approche HCR permettaient un marquage magnétique des bactéries grâce à la formation d'une structure secondaire composée d'acides nucléiques. Dans le contexte du développement d'une nouvelle technique de capture, il est important de comparer les avantages et inconvénients de chaque approche dans le cadre de leur utilisation dans une étude d'écologie microbienne.

1) Structure du marquage et applications potentielles

Le marquage magnétique avec des sondes polyribonucléotidiques (MISH) repose sur la formation d'un réseau complexe de sondes qui, de par la grande taille des sondes utilisées (plus de 200 bases), nécessite un travail minutieux de mise au point des conditions d'hybridation qui peut s'avérer long et fastidieux et freiner le développement de ce type d'approche. De plus la production des sondes peut aussi constituer un frein au développement de l'approche à plus grande échelle. Réalisée par transcription *in vitro* sur un produit PCR, la synthèse requiert, pour une cible donnée, d'avoir au minimum déterminé le génome du microorganisme ciblé ou d'une bactérie très proche (23S). En l'état actuel, l'approche se focalise uniquement sur le marquage 23S et donc se limite à un marquage taxonomique.

D'un autre côté, la HCR repose sur l'utilisation couplée d'une sonde initiatrice et de deux sondes amplificatrices, invariables, au cœur de la réaction de marquage. Ainsi, le choix des cibles peut être beaucoup plus large que dans le cadre du MISH et permet en théorie de cibler n'importe quelle séquence d'acides nucléiques d'intérêt. Le choix des sondes pour ces premières expérimentations s'est réalisé de manière préférentielle sur des sondes ciblant le 23S afin de mettre en compétition plus aisément les deux approches mais il reste tout à fait envisageable d'adapter le « design » des sondes afin de marquer d'autres portions du génome (marqueurs taxonomiques ou fonctionnels). Ces premiers résultats ouvrent ainsi la voie à un large panel d'applications dans le cas où ceux-ci viendraient à être confirmés en assurant la capture de bactéries issues d'échantillons complexes.

2) Sensibilité du marquage

Spécificité et sensibilité sont des critères clés lors du développement d'une méthode de marquage qui peuvent aussi permettre de comparer les deux approches en cours de développement.

Si l'on se réfère aux données de capture obtenues dans ce chapitre (cf. figure 47), on remarque que les fractions magnétiques, pour les sondes ciblant *E.coli* et *Pseudomonas* sont beaucoup plus importantes (environ 3 fois) dans le cas de l'utilisation d'un marquage de type MISH par rapport à un marquage de type HCR. La fraction magnétique est environ 3 fois plus importante lorsque le marquage est réalisé par MISH. Dans le cas des sondes dirigées contre *Acinetobacter* sp. ADP1, la comparaison est impossible car il semble que les conditions d'hybridation optimales pour le MISH n'ont pas été correctement définies comme en témoigne l'absence de capture de ces bactéries. Cependant, les résultats obtenues pour *Pseudomonas* et *E.coli* laissent supposer que des tendances similaires seraient observables pour *Acinetobacter*.

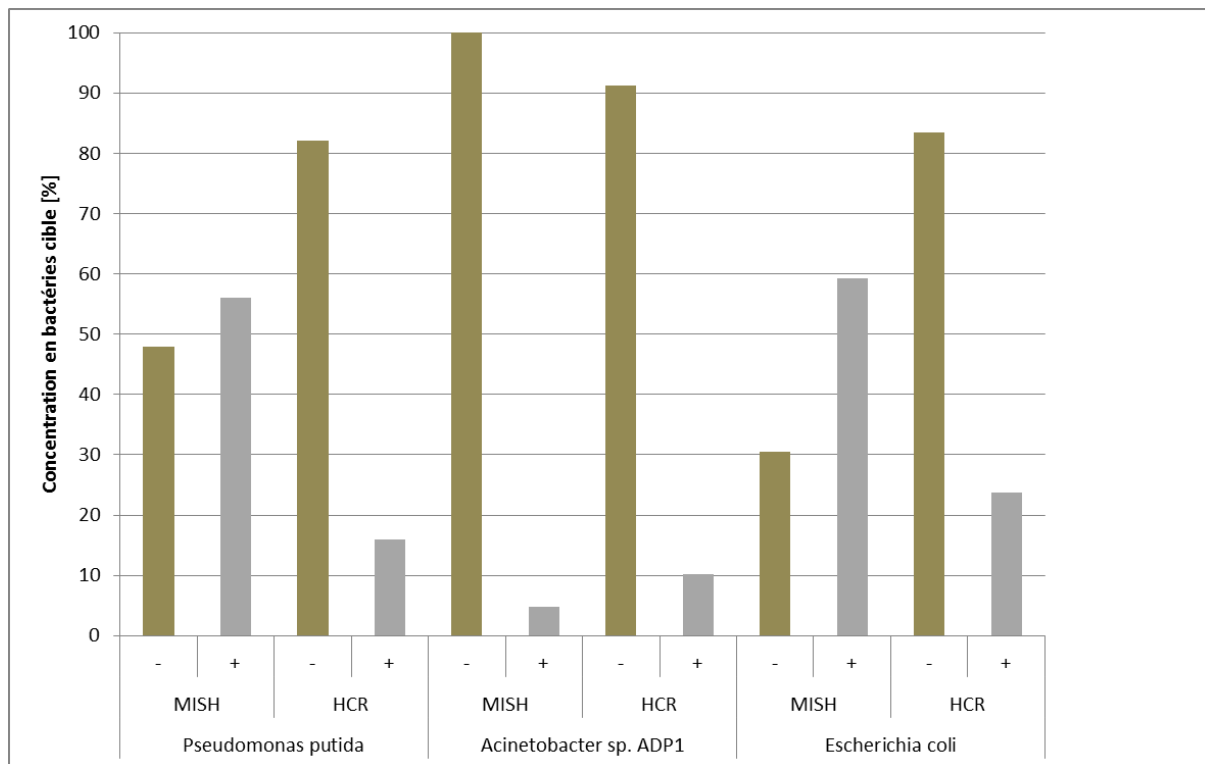


Figure 47 : Comparaison des résultats de capture pour des marquages avec MISH et HCR.

Résultats des qPCR 16S réalisées pour les 3 sondes (Pseudomonas putida, Acinetobacter sp. ADP1 et Escherichia coli) utilisées pour marquer leur souche cible respective par MISH (66 °C – 80 % formamide) et HCR. On remarque que la fraction magnétique (+) lorsqu'un marquage MISH est employé est beaucoup plus importante que dans le cas d'un marquage HCR.

Le marquage reposant sur l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques apparaît plus sensible que le HCR pour le marquage de bactéries. Ce point peut probablement être expliqué par la formation du réseau de sondes dont l'assemblage est plus aléatoire que dans le cas du HCR où cet assemblage est très ordonné. Il est donc fort probable que la structure secondaire formée soit plus importante, entraînant ainsi une plus forte quantité de biotines disponibles pour la liaison aux nanoparticules magnétiques d'où découlerait une sensibilité plus importante du marquage. Il sera intéressant d'approfondir ce point et d'arriver à quantifier la charge magnétique des bactéries marquées qui pourra permettre d'expliquer la différence de sensibilité entre les deux approches.

IV. Conclusions

L'objectif de nos travaux est de proposer et d'évaluer des méthodes pour la capture magnétique de microorganismes. Au cours de ce chapitre nous avons envisagé deux approches de marquage reposant toutes deux sur la formation d'une structure secondaire en acides nucléiques permettant la création d'un lien entre la zone d'hybridation et les nanoparticules magnétiques.

Le MISH tel que nous l'avons décrit repose sur l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques formant un réseau complexe, ce « manteau » de sondes permettant de greffer des nanoparticules magnétiques à la surface des bactéries. L'aspect aléatoire de la formation du réseau de sondes ainsi que la longue taille des sondes utilisées contraignent à réaliser un travail minutieux sur les conditions d'hybridation afin de déterminer au mieux le marquage spécifique ou non des échantillons.

De l'autre côté, la HCR magnétique est une technique plus récente qui a été adaptée pour le marquage magnétique dans le cadre de cette thèse. Cette méthode repose sur l'utilisation de trois sondes permettant un marquage spécifique des acides nucléiques cibles via la sonde initiatrice ainsi que l'apparition d'une structure linéaire par une réaction d'hybridation en chaîne entre les deux sondes amplificatrices. Les expérimentations menées dans le cadre de ce chapitre ont

permis de mettre en avant le potentiel de cette technique pour le marquage magnétique de bactéries.

Les prochains travaux seront orientés vers l'application de ces deux techniques de marquage à des échantillons plus complexes issus d'environnements telluriques afin d'illustrer le potentiel de ces approches dans un contexte se rapprochant des échantillons utilisés pour des études d'écologie microbienne.

Chapitre 3 : Capture de populations bactériennes spécifiques dans des suspensions bactériennes extraites d'échantillons environnementaux de type sol par MISH et HCR

I. Introduction

Réaliser l'inventaire le plus exhaustif possible des microorganismes présents dans des échantillons environnementaux ainsi que de leurs fonctions de façon à déterminer leur implication dans le fonctionnement de leur écosystème constitue un défi colossal auquel est confrontée l'écologie microbienne. De nouvelles approches tant techniques que conceptuelles doivent être développées comme celle que nous nous proposons de développer consistant à étudier population(s) par population(s) après en avoir séparé les cellules du reste du microbiote. Cette approche repose sur le marquage par des nanoparticules des populations bactériennes ciblées sur la base de critères taxonomiques ou fonctionnels lors d'une étape d'hybridation *in situ* et leur capture spécifique grâce aux propriétés du magnétisme. Populations après populations l'approche devrait pouvoir à terme compléter les analyses classiques de métagénomique et de séquençage afin de continuer le décryptage des microbiotes des environnements complexes. Nous avons présenté dans les chapitres précédents le développement de cette approche, les conditions à réunir en termes de caractérisation de sondes et de paramètres physico-chimiques d'hybridation pour atteindre le niveau voulu de spécificité ainsi que deux stratégies de marquage magnétique des bactéries pour assurer la meilleure sensibilité possible [183,228]. Nous décrivons dans le présent chapitre les premiers travaux réalisés dans le cadre de l'application de ces techniques MISH et HCR à des suspensions bactériennes extraites d'échantillons de sol.

II. Matériels et Méthodes

A. Extraction des bactéries

Avant extraction des bactéries, des échantillons de sol fraîchement prélevés ont été séchés à température ambiante puis tamisés à 2 mm.

Extraction Nycodenz : Les bactéries telluriques sont séparées du reste des constituants du sol par application d'une centrifugation différentielle sur gradient de Nycodenz. A cette fin, 50 grammes de sol sec ont été remis en suspension dans 180 ml de solution d'héxametaphosphate stérile (0.2 %) dans un tube Nalgène (250 ml) contenant plusieurs dizaines de billes de verre stériles de diamètre 1 mm pour incubation sous agitation pendant 2 heures à température ambiante afin de détacher les bactéries des constituants de la matrice tellurique pour les mettre en suspension. Après agitation, une première centrifugation de 1 minute à $240 \times g$ à 10°C permet la précipitation des plus grosses particules de sol. Le surnageant contenant la fraction bactérienne est filtré sur ouate stérile afin d'éliminer une autre partie des débris puis centrifugé à $3220 \times g$ pendant 20 minutes à 10°C afin de faire sédimenter les bactéries. Le culot contenant les bactéries est ensuite remis en suspension dans 35 ml de solution de NaCl 0.8 % de laquelle 20 ml sont prélevés pour être délicatement (sans mélange aucun) ajoutés à 11 ml d'une suspension de Nycodenz stérile (0.8g/ml) dans un tube Falcon de 50 ml. Après centrifugation pendant 40 minutes à $3220 \times g$ à 10°C avec accélération et décélération lente pour éviter toute perturbation du gradient, le halo translucide apparaissant à l'interface entre les solutions de NaCl et de Nycodenz et qui contient la suspension de bactéries est récupéré manuellement à l'aide d'une pipette. Les cellules bactériennes sont remises en suspension dans une solution de NaCl 0.8 % (qsp 40 ml) et soumises à 2 cycles de centrifugation ($9000 \times g$, 20 minutes, 10°C) remise en suspension dans 10 ml de NaCl 0.8 % pour lavage avant une remise en suspension dans 1 ml de NaCl 0.8 % dans un tube Eppendorf et une ultime centrifugation à $13000 \times g$ pendant 5 minutes à 10°C avant reprise du culot dans 1 ml de tampon TE (10 mM Tris HCl pH 8.0 ; 1 mM EDTA) et conservation dans la glace avant utilisation.

Préparation des échantillons : La concentration en cellules bactériennes de ces dernières suspensions est déterminée comme précédemment indiqué de façon à pouvoir ajouter dans une partie des échantillons jusqu'à 10 % de cellules des bactéries ciblées (*Escherichia coli* ou *Pseudomonas putida*) en vue de constituer des échantillons contrôles enrichis en ces bactéries. Ces échantillons sont ensuite incubés dans une solution de paraformaldéhyde à 3 % à 4°C pendant la nuit pour fixation avant application de 3 cycles de centrifugation ($10000 \times g$, 5 minutes à 10°C) remise en suspension dans une solution de PBS puis reprise finale dans 1 ml de PBS.

B. Marquage des cellules par hybridation *in situ*

1) MISH

Préparation des sondes : Les sondes polyribonucléotidiques d'une taille avoisinant les 250 nucléotides ont été obtenues par transcription *in vitro* sur des produits PCR incorporant un promoteur de transcription comme décrit au chapitre précédent et suivant les recommandations de la littérature [172,183]. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide du kit Taq DNA Polymerase native (Thermo-Fisher) en suivant les recommandations du fournisseur. La matrice ADN utilisée pour la réaction de PCR était l'ADN génomique des 3 souches étudiées (*Escherichia coli* DH5 α , *Acinetobacter* sp. ADP1 et *Pseudomonas putida* préalablement présentées dans le chapitre 2) isolé à l'aide du kit « Nucleospin Tissue® (Macherey Nagel) en suivant les indications du fournisseur. Les amorces utilisées ciblant le domaine III de l'ARNr 23S étaient 1900V [142] (5'–MAD GCG TAG BCG AWG G-3') et 317RT [170] (5'-**TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GAC CWG TGT CSG TTT HBG TAC**-3') incluant un promoteur de transcription pour l'ARN polymérase T7 (**en gras**).

Le cycle PCR comprend une première étape de dénaturation de 10 minutes à 95 °C, puis 35 cycles regroupant les trois étapes suivantes : 95 °C pendant 30 secondes, 53 °C pendant 1 minute puis 72 °C pendant 1 minute 30 ; une dernière étape de 10 minutes à 72 °C termine la réaction d'amplification. Cette dernière permet d'obtenir un produit PCR d'environ 250 nucléotides dont la taille a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les sondes sont ensuite obtenues par transcription *in vitro* à partir des produits PCR préalablement purifiés sur gel à l'aide du kit « *AmpliscribeTM T7-FlashTM Biotin RNA Transcription Kit* » en suivant les recommandations du fournisseur. Ce kit contient une ARN polymérase T7 ainsi que des nucléotides A, G, C ainsi que des Uraciles biotinylées qui permettront d'obtenir en une seule étape de transcription des sondes ARN porteuses de nombreuses biotines. Les sondes sont ensuite purifiées sur colonne avec un gel de Sephadex (illustraTM MicrospinTM G-50 Column GE Healthcare), permettant en deux centrifugations d'obtenir une solution propre en ARN qui pourra être finalement quantifiée par spectrophotométrie (NanophotometerTM IMPLÉN).

Hybridation in situ : 5×10^7 bactéries préalablement fixées, issues des échantillons extraits sur gradient Nycodenz ont été remises en suspension dans 100 µl de tampon d'hybridation (900 mM NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM Tris HCl pH 8, 5 mM EDTA pH 8 et 80 % formamide (volume/volume)) en mélange avec 2,5 µg de sondes biotinylées fraîchement préparées. La première étape de dénaturation a été réalisée en incubant les échantillons à 80 °C pendant 20 minutes, puis l'hybridation a été réalisée à 53 °C et 66 °C pendant 4 heures. Après hybridation, les échantillons ont été centrifugés à $10000 \times g$ pendant 5 minutes. Une fois le surnageant éliminé, le culot a été repris dans un tampon de lavage (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA) préchauffé à la température de rinçage puis incubé 20 minutes à 56 °C ou 69 °C selon que l'échantillon ait été marqué à 53 °C ou 66 °C. Après une nouvelle centrifugation à $10000 \times g$ pendant 5 minutes, les culots comprenant les bactéries marquées ont été remis en suspension dans 190 µl de PBS refroidi dans la glace auxquels sont ajoutés 10 µl de nanoparticules magnétiques (Streptavidin Microbeads – Miltenyi) pour incubation pendant 12 heures à 4 °C avant utilisation dans les expériences sur microsystème magnétiques.

2) **HCR**

Sondes utilisées : Les sondes initiatrices utilisées pour les marquages HCR magnétiques sont les suivantes **Ppu-I** (5'-CCG AAT ACA AGC ATC AAC GAC TAG AAA AAG CTG GCC TAA CCT TC-3') et **ECO1167-I** (5'-CCG AAT ACA AGC ATC AAC GAC TAG AAA AAG CAT AAG CGT CGC TGC CG-3') ciblant respectivement les souches *Pseudomonas putida* et *Escherichia coli* DH5α. Le couple de sondes amplificatrices utilisées est celui décrit dans Yamaguchi et collaborateurs [179,222] H1 (5'-TCT AGT CGT TGA GCT TTG TAT TCG GCG ACA GAT AAC CGA ATA CAA AGC ATC-3') et H2 (5'-CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAG ATG CTT TGT ATT CGG TTA TCT GTC G -3') toutes deux ayant été synthétisées pour être biotinylées afin de leur permettre d'interagir avec les nanoparticules magnétiques.

Hybridation in situ : 5×10^7 bactéries préalablement fixées, issues des échantillons extraits sur gradients de Nycodenz ont été remises en suspension dans 100 µl de tampon d'hybridation (900 mM NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM Tris HCl pH 8, et 20-40 % formamide (volume/volume)) en

présence de 2,5 µg de sondes initiatrices Ppu-I, Eco1167-I ou ACA652-I selon les échantillons. Après hybridation, les échantillons ont été centrifugés à 10000 × g pendant 5 minutes. Le surnageant éliminé, le culot a été repris dans un tampon de lavage préchauffé (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA) puis incubé 20 minutes à 56 °C. Après lavage, les échantillons ont été repris dans 100 µl de tampon d'amplification (50 mM Na₂HPO₄, 0,9 M NaCl, 0.01 % SDS) contenant 2,5 µM des sondes H1 et H2 préalablement chauffées séparément à 95 °C pendant 90 secondes pour être incubées d'abord à température ambiante pendant 20 minutes puis à 46 °C pendant 2 heures. Après centrifugation à 10000 × g pendant 5 minutes et remise en suspension dans 190 µl de PBS refroidi dans la glace, les cellules sont additionnées avec 10 µl de la suspension de nanoparticules magnétiques (Streptavidin Microbeads – Miltenyi) et incubées pendant 12 heures à 4 °C avant d'être traitées sur les microsystèmes magnétiques.

C. Tri en système microfluidique

Fabrication du microsystème : cf. Chapitre 2.

Tri cellulaire : Des échantillons de bactéries extraites du sol et traitées par hybridation *in situ* magnétique, 50 µl ont été prélevés afin d'être subséquentement analysés dans le but de définir qualitativement et quantitativement la composition taxonomique de cette fraction d'entrée (fraction 1). Le reste de l'échantillon (50 µl) a été injecté sous débit constant (1µl/min) dans le microsystème magnétique jusqu'à passage complet de l'échantillon. La solution récupérée en sortie du microsystème constitue la fraction négative (fraction 2). Les cellules retenues dans le microsystème ont ensuite été récupérées par injection de 50 µl d'une solution de PBS sous un débit beaucoup plus important (250 µl/min). La solution récupérée est la fraction magnétique (fraction 3).

D. Analyse de la biodiversité des fractions récoltées

Extraction ADN : L'ADN total des cellules récupérées dans chacune des fractions a été extrait à l'aide du kit « *Nucleospin soil*® » (Macherey Nagel) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN a ensuite été quantifié à l'aide du kit « *Qubit*® *dsDNA HS Assay kit* »

(ThermoFisher). La lyse cellulaire et la libération de l'ADN génomique ont été effectuées par traitement aux ultrasons en plaçant les échantillons à 3 reprises pendant 10 secondes dans un bain d'ultrasons avec 1 minute de repos entre chaque bain avant traitement à 95 °C pendant 10 minutes puis addition au mix PCR pour la préparation des échantillons de séquençage MiSeq.

Séquençage MiSeq : Un séquençage 2 × 300 pb sur la région V3-V4 du gène 16S a été réalisé en utilisant la technologie MiSeq de Illumina en suivant les recommandations du fournisseur [229] ainsi que les amorces « 16S Amplicon PCR Forward Primer » (5'TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG3') et « 16S Amplicon PCR Reverse Primer » (5'GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C3') générant un produit PCR d'environ 460 pb.

Annotation et Analyse : Une fois les données de séquençage acquises, une première série d'analyses a été réalisée en utilisant le pipeline dévolu à l'exploitation des données de séquençage 16S proposé par la société Illumina utilisant le « Ribosomal Database Project Classifier » [230] contre la base de donnée GreenGenes. Des analyses en composantes principales ont été réalisées à partir des tables de contingences obtenues post annotation pour les différentes fractions permettant de les comparer à l'aide du logiciel Stamp [231].

III. **Résultats et Discussion**

Le protocole basé sur l'utilisation d'un gradient de Nycodenz [99] pour extraire les cellules bactériennes hors de la matrice complexe que constitue le sol est reconnu comme la méthode présentant la meilleure efficacité en termes de nombre de cellules extraites et de purification de la suspension de bactéries des nombreux et divers constituants du sol. L'application de nombreuses techniques pour l'étude des microorganismes telluriques est impactée par la présence dans le sol de composés humiques ainsi que de particules d'argile. Ces éléments sont à l'origine de phénomènes d'adsorption pouvant aller jusqu'à empêcher la réalisation de marquages des microorganismes par immunomarquage ou hybridation *in situ*. Du fait que le marquage des bactéries extraites du sol est réalisé en milieu liquide, il est d'autant plus important de tenter de limiter le plus possible les potentielles interactions (adsorption) entre les sondes et les

« *polluants* » du sol. L'application du protocole Nycodenz au sol choisi pour les expérimentations a permis de limiter l'extraction de contaminants et a conduit à l'extraction en routine d'environ 10^7 cellules/g de sol.

Des tentatives de simplification du protocole d'extraction tout en comptant potentiellement en accroître l'efficacité quantitative ont été réalisées en le limitant à la mise en suspension des bactéries du sol par agitation en présence de billes de verre dans une solution d'héxamétophosphate de sodium (HMP), à la sédimentation naturelle (soit 1 g) des plus grosses particules de sol avant lavage à plusieurs reprises du surnageant. Si l'omission de l'étape de centrifugation sur gradient de Nycodenz réduit effectivement la perte de cellules (10^8 cellules par gramme de sol) la trop importante quantité d'impuretés demeurant dans la suspension bactérienne extraite inhibe totalement l'étape subséquente d'hybridation (résultats non montrés). Ces résultats montrent l'importance de l'étape de purification sur gradient de Nycodenz, qui sans être totale conduit à l'obtention d'une suspension bactérienne compatible avec les étapes ultérieures d'hybridation et de séparation des cellules hybridées dans le système microfluidique. Cependant, toute tentative d'accroissement de la concentration en bactéries par cumul de 2 ou plusieurs suspensions « Nycodenz » s'est soldée par un échec lors des étapes ultérieures d'hybridation, certainement dû au fait d'un cumul des impuretés résiduelles de chaque extraction.

Le dispositif de tri utilisé développé lors de différents travaux réalisés au sein du laboratoire permet de capturer un nombre de cellules magnétiques de l'ordre de 10^6 avant d'atteindre la saturation de l'aimant [172]. Afin de limiter les risques de contamination entre échantillons, chaque tri a été réalisé sur une puce microfluidique unique (même micro-aimants, mais nouveau microcanal). Le processus doit être réalisé avec un débit (très lent) de $1\mu\text{l}/\text{min}$ afin de laisser le temps aux bactéries magnétiques d'être attirées efficacement par l'aimant lors de leur trajet dans le microsystème. Il a ainsi pu être déterminé expérimentalement la taille optimale des échantillons pour la capture de bactéries sur puces microfluidiques qui doivent être composés d'environ 5.10^7 bactéries dont 15 % de cellules cibles ($7,5.10^6$ cibles) dans un volume total de $100\mu\text{l}$, le facteur limitant étant la saturation des aimants.

A. MISH

Cette approche a été la première à être utilisée pour la capture de bactéries marquées à partir des suspensions bactériennes extraites de sol par la technique « Nycodenz ». Après dénombrement des bactéries indigènes, des suspensions contrôles ont été enrichies par l'ajout de 10-15 % de cellules cultivées *in vitro* appartenant aux populations ciblées par les sondes, à savoir *Pseudomonas putida* et *Escherichia coli*. Les paramètres d'hybridation ont été choisis pour atteindre soit une forte spécificité (66 °C) soit un niveau de spécificité plus relâché (53 °C).

Le tri cellulaire dans les microsystèmes a été contrôlé visuellement par observation microscopique. Ces observations ont confirmé pour chacune des expérimentations la présence de bactéries marquées et non marquées dans les échantillons indiquant qu'une hybridation entre sondes et cibles avait eu lieu, sans pourtant renseigner sur le niveau de spécificité. De précédents travaux ont également confirmé le faible pourcentage de pertes de cellules lors du passage des échantillons dans le microsystème. En effet, le nombre cumulé de cellules bactériennes dans les 2 suspensions en sortie, i.e. cellules directement éluées car non marquées puis celles marquées retenues sur les micro-aimants avant d'être décrochées par un accroissement du flux n'était jamais inférieur de plus de 10 % du nombre de cellules dans la suspension initiale introduite dans le microsystème (de l'ordre de 10^5 - 10^6) [172].

L'efficacité de l'extraction de l'ADN génomique hors des cellules bactériennes (indigènes et inoculées) est une autre source potentielle de biais. De nombreux protocoles de lyse des bactéries et de purification de l'ADN ont été publiés [54]. L'étape initiale de lyse implique des traitements physiques (chocs thermiques [232] ou par ultrasons [2]), chimiques (notamment avec des détergents) ou enzymatiques (notamment le lysozyme) réalisés individuellement ou en combinaison. Une large gamme de méthodes de purification des solutions d'ADN extraites est également disponible mais quel que soit le procédé utilisé une fraction significative de l'ADN est perdue lors de ces étapes. Cette limitation a été observée expérimentalement avec le traitement de suspensions bactériennes à l'aide du kit *Nucleospin soil* qui n'a permis d'extraire une quantité d'ADN génomique détectable par la méthode Qubit DNA HS que pour la fraction 1 (environ 5 ng/μl). Ces résultats confirment la plus faible efficacité d'extraction d'ADN bactérien à partir du sol des méthodes indirectes (extractions cellulaires avant lyse) (en comparaison des méthodes directes (lyse *in situ* et extraction puis purification de l'ADN extrait) [233] en particulier du fait

d'une perte d'ADN lors des traitements de lyse des cellules et de purification des acides nucléiques.

Suite à ces biais et considérant que la seule utilisation des ADN bactériens extraits était de servir de matrices à des réactions PCR peu sensibles aux impuretés, le protocole d'extraction que nous avons ensuite utilisé s'est limité à un traitement physique des cellules par application de chocs aux ultrasons (Ultrasonic Cleaner Model 28H 230V 50/60 Hz) pendant 30 secondes suivis d'un traitement thermique par incubation à 100 °C pendant 10 minutes. Aucune étape de purification n'était ajoutée, le lysat cellulaire étant directement utilisé dans la réaction PCR. Celles-ci se sont révélées systématiquement positives comme le montre la production de produits d'amplification de la taille attendue (environ 460 pb) (cf. figure 48), confirmant la libération d'une quantité d'ADN génomique suffisante pour initier la réaction PCR et sa non inhibition par les impuretés résiduelles.

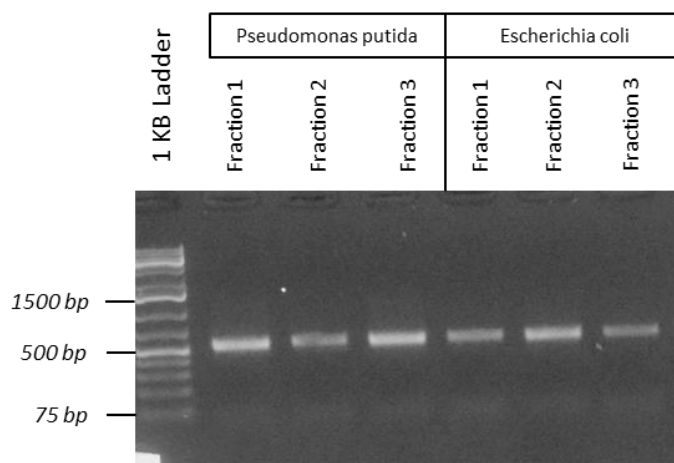


Figure 48 : Contrôle de la taille des produits PCR (taille théorique $\approx$ 460 pb), par électrophorèse sur gel d'agarose, obtenus sur l'ADN extrait des différentes fractions lors de tris magnétiques sur microsystème. Les produits PCR sont ensuite utilisés pour le séquençage.

L'annotation des séquences obtenues sur des échantillons de sol présentait une forte domination du phylum des protéobactéries qui représentaient 41 % du total des séquences annotées (affiliations aux bactéries) figurant parmi de nombreux autres phyla tels que les acidobactéries (10%) les planctomycetes (9%), les bacteroidetes (4%), les actinobactéries (2%) les firmicutes (1%). Ces proportions sont en accord avec les données de la littérature [145] établissant

l'inventaire des phyla bactériens les plus représentés dans des banques d'ADN metagénomique issues de divers sols avec une domination et détection systématique des protéobactéries (environ 39 %) et acidobactéries (20 %), les autres phyla étant moins courants et même parfois non détectés. A noter dans les échantillons analysés ici l'abondance moindre des Acidobactéries (9 % contre 20 % en moyenne) et Actinobactéries (4 % contre 10 % en moyenne). Ces résultats comparables avec ceux de la littérature valident ainsi la méthode d'extraction utilisée.

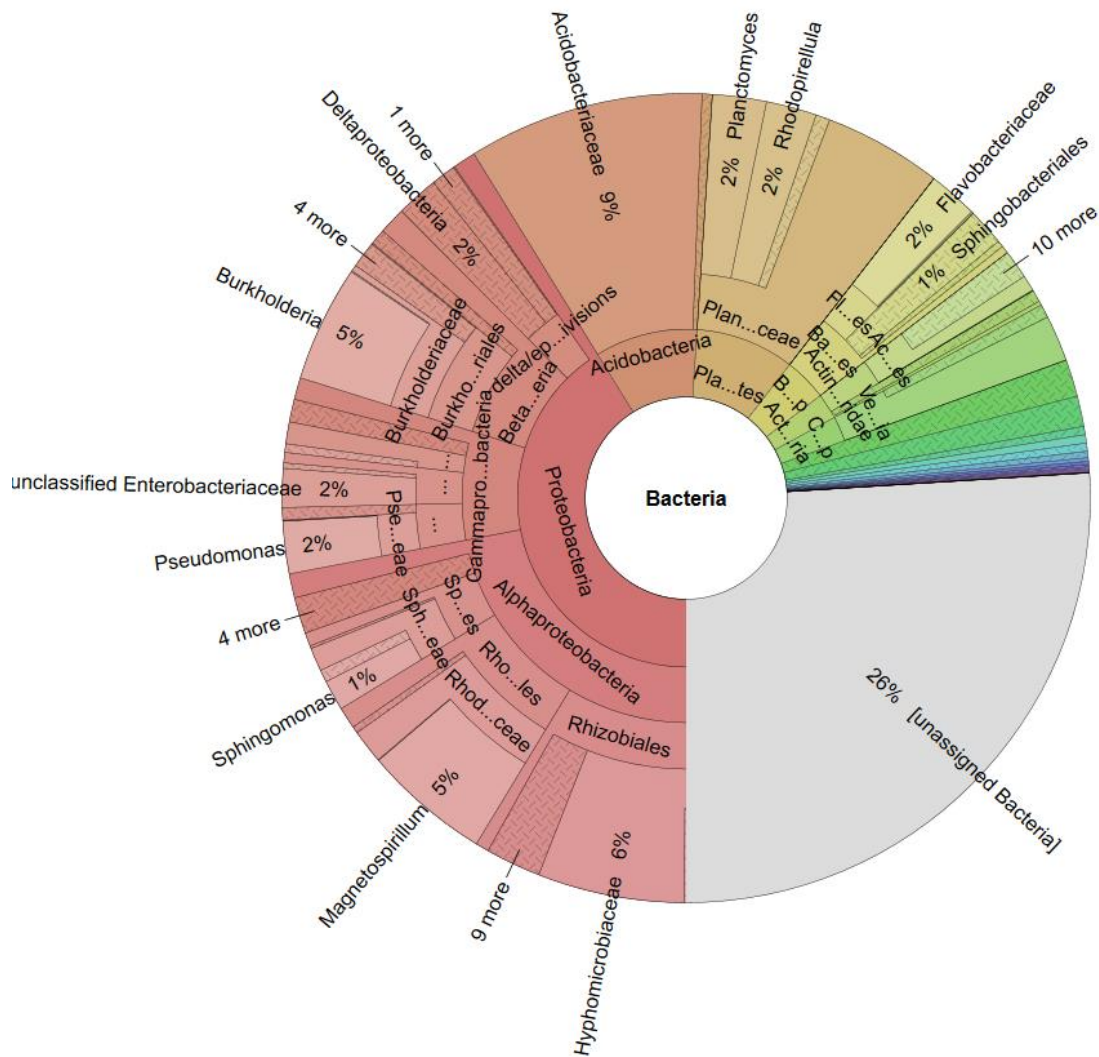


Figure 49 : Représentation de type Krona de données 16S annotées via le pipeline Kraken-metagenomic de la fraction 1 avec une lyse directe des cellules extraites avant la réaction d'amplification par PCR.

Les suspensions bactériennes extraites du sol (Nycodenz) enrichies avec des cellules d'*E.coli* ou de *Pseudomonas putida* et hybridées avec les sondes correspondantes selon l'approche MISH ont été traitées sur les microsystemes pour séparer bactéries hybridées et donc marquées par les nanoparticules de celles non hybridées. Les échantillons ont été soumis à deux conditions d'hybridation distinctes avec des conditions stringentes (66 °C) ou peu stringentes (53 °C) dans un tampon d'hybridation contenant 80 % de formamide. Les suspensions bactériennes récupérées ont été traitées par la méthode directe de lyse physique (ultrasons /ébullition et sans purification) fournissant une solution d'ADN non quantifiable directement mais suffisamment concentrée pour que l'amplification PCR ciblant les régions divergentes du gène 16S génère systématiquement les produits PCR de la taille attendue, quelle que soit la température d'hybridation utilisée (53 et 66 °C). Les produits PCR ont été séquencés et les données analysées comme indiqué dans le M&M pour fournir les résultats présentés en figure 50.

La fraction 1 est constituée du mélange de cellules hybridées et non hybridées avant leur tri magnétique sur le microsysteme. L'analyse bio-informatique des séquences ADN des produits PCR générés à partir de l'ADN génomique de ces cellules devrait permettre d'estimer la diversité au sein de l'échantillon mais aussi, en quantifiant la proportion de séquences affiliées à la souche introduite, de déterminer le biais lié à l'extraction de l'ADN. Dans chacun de ces échantillons dits « artificiels » car enrichies avec des cellules de *Pseudomonas putida* ou d'*Escherichia coli* 17 % des séquences ont été annotées comme correspondant aux souches introduites. Ce résultat est dans l'ordre de grandeur attendu puisque la proportion de cellules inoculées était de 10 %. La faible surestimation observée peut s'expliquer par la prise en compte de cellules bactériennes indigènes s'ajoutant aux cellules ajoutées, indiquant que ces cellules ont été efficacement traitées par le protocole de lyse et que leur ADN a pu être amplifié avec la même efficacité que celui des souches introduites. Ce résultat montre également que dans ces microbiotes, aucune population indigène phylétiquement proche de chacune des 2 souches inoculées n'était en nombre suffisant pour modifier significativement le ratio entre bactéries indigènes et inoculées.

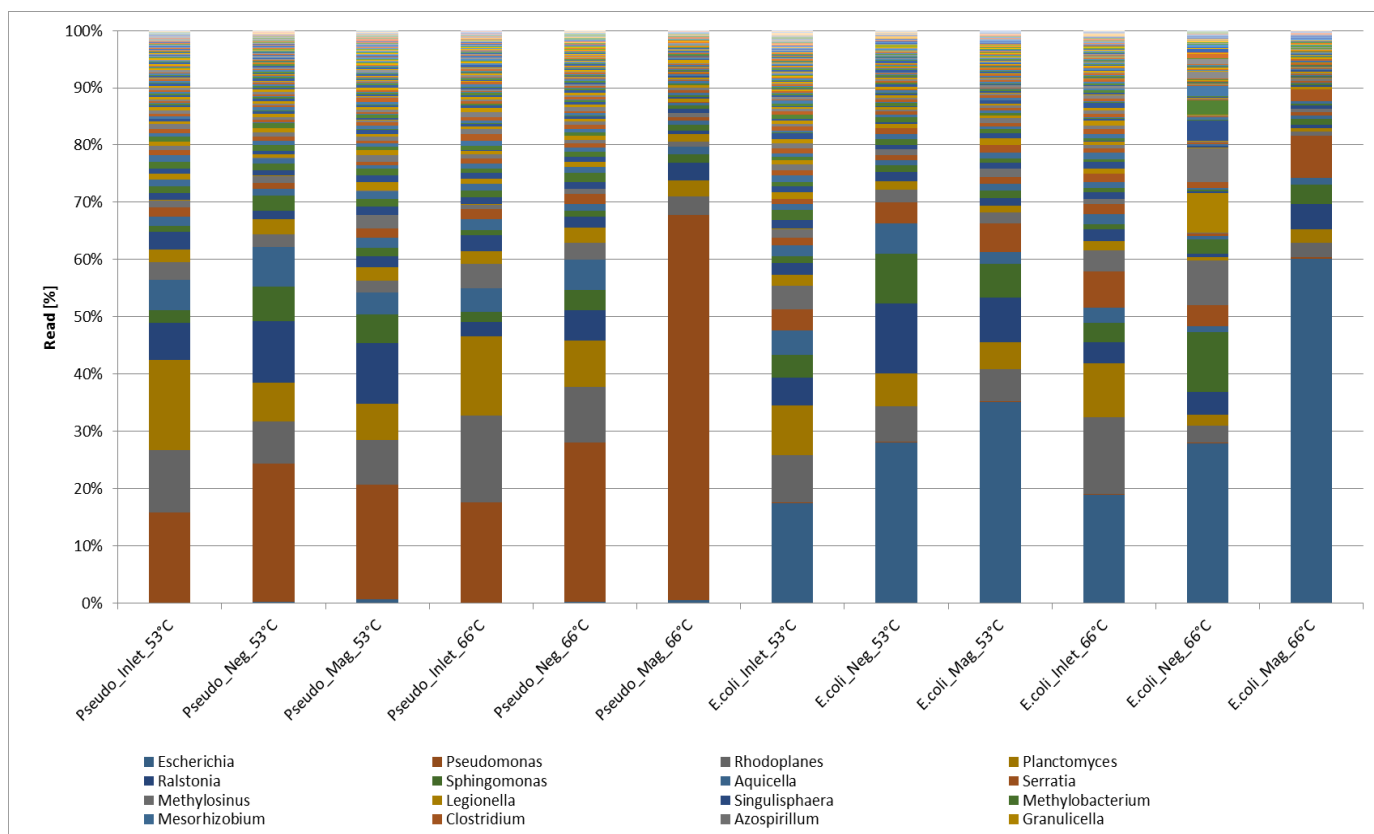


Figure 50 : Abondance relative des séquences annotées au niveau du genre sur les fractions 1 (inlet) 2 (Neg) et 3 (Mag) récoltées pour des suspensions supplémentées avec *Pseudomonas* et *E.coli* et marquées par MISH avec les sondes correspondantes, à 53 ou 66 °C.

La fraction n°2 ne doit en théorie contenir que les bactéries indigènes non hybridées, excluant les cellules inoculées et celles parmi les populations indigènes ayant répondu positivement à l'hybridation car suffisamment proches phylogénétiquement des souches bactériennes introduites. Pour chacune des 2 conditions testées (addition de *Pseudomonas putida* et *Escherichia coli*) une très forte similitude des profils taxonomiques entre les fractions 1 et 2 a été détectée. Ces résultats ont été observés pour les 2 conditions d'hybridation testées, très « stringentes » ou plus relâchées. Ceci indique que la possibilité laissée à l'hybridation sous conditions peu « stringentes » de concerner d'autres bactéries indigènes, phylétiquement proches des souches introduites ne modifiait pas significativement l'inventaire bactérien de la suspension par rapport aux conditions de forte spécificité. C'est seulement l'analyse taxonomique de la fraction 3 qui devrait permettre d'évaluer le niveau de contamination par des bactéries non cibles qu'engendre le recours à des conditions d'hybridation relâchées.

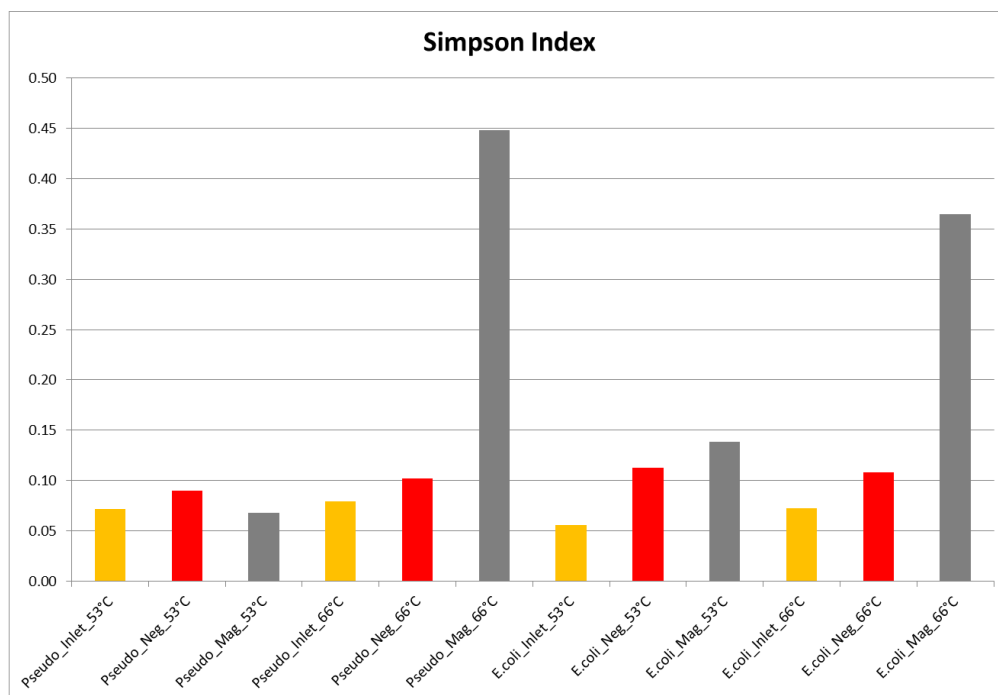


Figure 51 : Index de Simpson calculé pour les différents échantillons récoltés lors des expériences de tri. Seules les fractions magnétiques récoltées lorsque des conditions d'hybridation « stringentes » sont utilisées ont un indice de Simpson élevé (>0.35) témoignant d'une diversité réduite.

Les fractions 1 et 2 présentent un niveau de diversité élevé (indice de Simpson < 0.1) comparable à celui présenté à la figure 50 avec une large majorité de protéobactéries (environ 60 %) valeur non surprenante en raison de l'ajout artificiel des cellules de *Pseudomonas* ou *E.coli* dans les échantillons. A ces dernières s'ajoutent des planctomycetes (environ 10 %) puis les Acidobactéries (1 %) en proportion faible par rapport à la littérature, les Actinobactéries (2 %) et Chloroflexii (1 %) alors que les autres phyla représentent moins de 1 % des annotations.

Une légère augmentation de l'indice de Simpson dans la fraction numéro 2 par rapport à la fraction initiale est observée, possiblement due à une perte de quelques microorganismes très faiblement représentés au sein de l'échantillon.

Pour compléter ces données, des ACP générées à l'aide du logiciel Stamp, ont été réalisées sur les données de séquençage afin d'illustrer le niveau de proximité des différents échantillons. Les deux conditions d'hybridation testées ne discriminent pas les fractions numéro 2 dont les composantes biologiques restent relativement proches de ceux des échantillons des

fractions numéro 1 (cf. figure 53). Ce résultat est quelque peu surprenant si l'on considère que des conditions d'hybridation relâchées auraient dû permettre à des bactéries représentant une fraction significative du microbiote, car suffisamment proches phylétiquement des bactéries cibles, d'être marquées magnétiquement lors de l'hybridation de façon à déséquilibrer plus que ce qui a été observé les différentes fractions (1 et 2) récoltées.

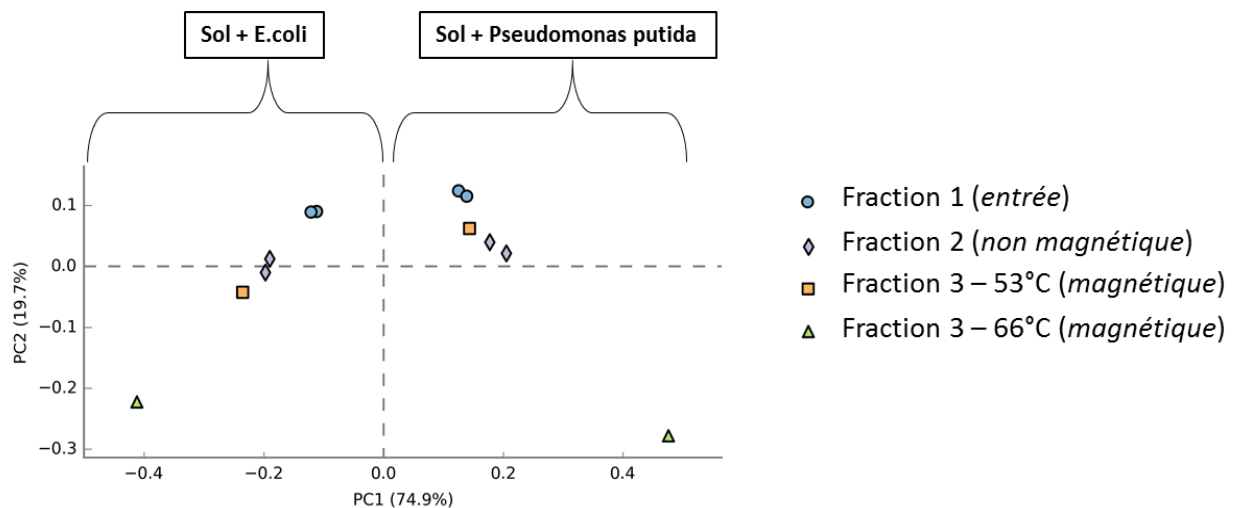


Figure 52 : Analyse en composante principale (ACP) entre les différentes fractions récupérées lors des expériences d'enrichissement.

Les échantillons enrichis en E.coli ou Pseudomonas forment deux groupes clairement distincts sur l'ACP. Se distinguent clairement du reste des échantillons ceux correspondant aux fractions 3 obtenues lors de l'utilisation de conditions d'hybridation « stringentes ».

Les bactéries détectées dans la fraction 3 devraient être celles qui ayant été hybridées avec les sondes marquées avec les nanoparticules magnétiques ont été retenues sur le réseau de micro-aimants avant que l'augmentation du flux ne les décroche, les séparant ainsi de celles non hybridées éluées initialement dans la fraction 2. L'analyse taxonomique des fractions 3 révèle toutefois une plus grande différence entre conditions d'hybridation « stringentes » et relâchées que celles observées avec les bactéries de la fraction 2. C'est ainsi que sur l'analyse ACP les données provenant d'échantillons pour lesquels le marquage a été réalisé avec des conditions d'hybridation peu « stringentes » (53 °C) ne séparent pas clairement ces échantillons de ceux des fractions 1 (entrée) et 2 (bactéries non hybridées). Pour la fraction 3, bactéries marquées par la sonde *Pseudomonas putida*, l'indice de diversité calculé est de 0.06750, valeur proche des indices

calculés pour les fractions associées (fraction 1 : 0.07174 et fraction 2 : 0.09022). Pour *E.coli* l'indice de Simpson était légèrement supérieur (0.13832) indiquant un niveau de diversité légèrement inférieur que ceux des fractions 1 et 2 (0.05587 et 0.11278) mais ne permettant pas de clairement isoler cet échantillon des précédents. Ce résultat pourrait s'expliquer par la compétition pour l'accès aux sondes qu'exerceraient des bactéries indigènes plus ou moins éloignées taxonomiquement de la cible définie par la sonde mais capables de réaliser des duplex sondes-cibles stables en dépit de mésappariements. De ce fait, des cellules inoculées échapperaient à l'hybridation du fait d'un manque de sondes et ne pourraient être retenues sur les aimants.

Les données de séquençage générés avec les bactéries de la fraction 3 préalablement hybridées sous forte « stringence » (66 °C comme température d'hybridation) séparent par contre très distinctement sur l'analyse ACP les fractions 3, quelle que soit la sonde utilisée (ciblant *Pseudomonas putida* ou *Escherichia coli*). Ces résultats s'expliquent par la forte occurrence de séquences correspondant aux bactéries cibles : 60 % pour *E.coli* et 68 % pour *Pseudomonas putida*. Ces résultats couplés à l'augmentation de l'indice de Simpson (cf. figure 52) (indiquant une réduction de la diversité) confirment l'efficacité de la méthode pour capturer les cellules cibles. L'intérêt de combiner au sein d'un même échantillon des bactéries cibles et des bactéries indigènes tient au fait que peut être évaluée également la réelle spécificité de la méthode. Les 40 % et 32 % de séquences annotées comme ne provenant pas des bactéries cibles peuvent correspondre à des bactéries indigènes ayant répondu positivement à l'hybridation en dépit de la forte « stringence » de la réaction du fait d'une proximité phylogénétique élevée avec *E.coli* ou *Pseudomonas putida*. Elles peuvent aussi témoigner des limites de l'approche en révélant des cellules qui se sont adsorbées sur les aimants indépendamment de toute force magnétique et que seul le flux élevé a pu entraîner. Une autre hypothèse concerne une hybridation totalement non spécifique avec un duplex stabilisé en dépit d'un nombre très élevé de mésappariements ou une adsorption de la sonde à la surface de la cellule.

Certaines de ces hypothèses peuvent être confirmées ou infirmées en analysant la composition taxonomique des échantillons composant les fractions 3. Lorsqu'est uniquement considérée la biodiversité des bactéries non cibles des différentes fractions 3 on observe dans les analyses ACP leur regroupement pour former un groupe compact quelle que soit la provenance de l'échantillon

(cf. figure 53). Ce résultat indique un profil de diversité très proche entre ces échantillons malgré les différents marquages réalisés. Ces résultats sont plutôt surprenants car il aurait plutôt été attendu que la sélection par les sondes produise un plus fort niveau de diversité des bactéries non cibles dans la fraction magnétique dont la composition devrait plus s'apparenter taxonomiquement au taxon défini par la sonde avec par conséquent des différences marquées entre les différents échantillons. Seules les bactéries cibles ajoutées seraient ainsi responsables des différences notées entre les échantillons sans impact des bactéries indigènes.

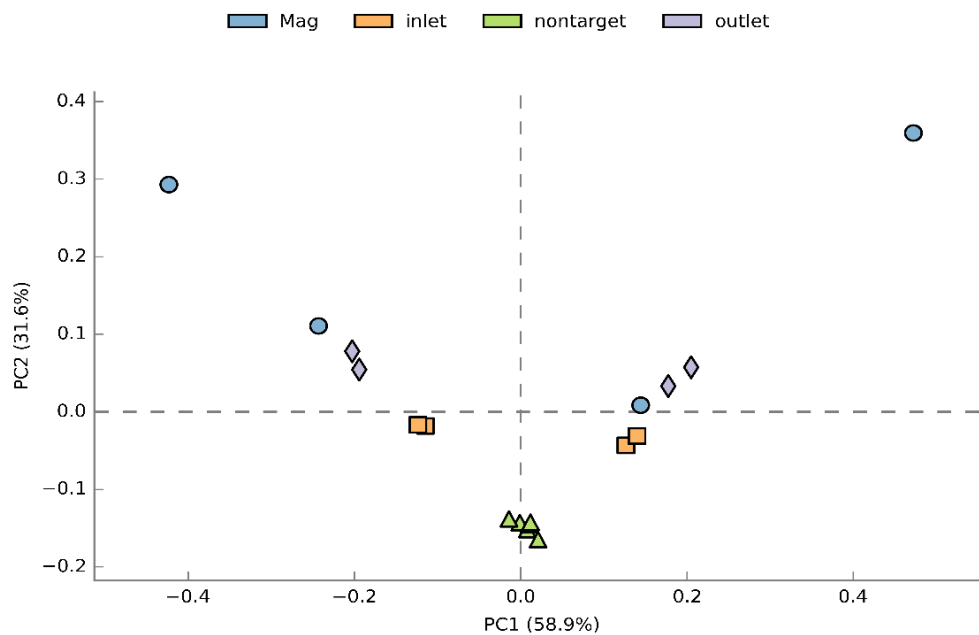


Figure 53 : Analyse ACP incluant les données sur les bactéries non-cibles (extraites des fractions 3 (magnétiques) et des fractions 1 (entrée)).

Les données « nontarget » regroupent les données d'annotation des différents échantillons dans lesquelles ont été supprimées les bactéries cibles du marquage (E.coli ou Pseudomonas). Ces données forment un groupe compact sur l'ACP illustrant leur proximité en termes de composition.

B. HCR

Sont rapportés ici les résultats des tentatives de capture réalisées à l'aide d'un marquage HCR sur des suspensions bactériennes extraites de sol et supplémentées de bactéries *E.coli* et *Pseudomonas*. Les suspensions bactériennes extraites du sol (Nycodenz) supplémentées avec des cellules d'*E.coli* ou de *Pseudomonas putida* et hybridées avec les sondes correspondantes selon l'approche HCR ont été traitées comme pour un marquage MISH pour la capture magnétique sur le microsystème ainsi que pour le séquençage du gène 16S et l'annotation des séquences. Les échantillons ont été soumis à des conditions d'hybridation « stringentes » à 56 °C avec des tampons d'hybridation différents selon la sonde utilisée avec pour *Pseudomonas putida* 20 % de formamide et pour *Escherichia coli* 40 % de formamide.

Les échantillons de sol supplémentés avec des cellules *Escherichia coli* n'ont pu être analysés correctement en raison de résultats d'annotation ininterprétables. Chacune des fractions comportaient environ 70 % des séquences affiliées aux entérobactéries à savoir 77 % dans la fraction d'entrée, 62 % de séquences annotées dans la fraction négative et 79 % pour la fraction magnétique. Cette surreprésentation des séquences affiliées aux *Escherichia coli* est quelque peu incompréhensible justifiant de considérer comme ininterprétable cette expérimentation préliminaire.

Les expérimentations réalisées avec la sonde *Pseudomonas putida* produisent une fraction n°1 (fraction d'entrée) constituée des cellules de *Pseudomonas putida* additionnées pour 15 % des séquences et de bactéries indigènes (85 %) dont l'annotation des séquences révèle des protéobactéries (majoritaires avec 52 %), suivies par les bacteroidetes (10 %), les acidobactéries (5 %), les planctomycetes (5 %), les chlamydiae (4 %) et les actinobactéries (4 %) les autres phyla représentant 1 % ou moins des données analysées (cf. figure 54).

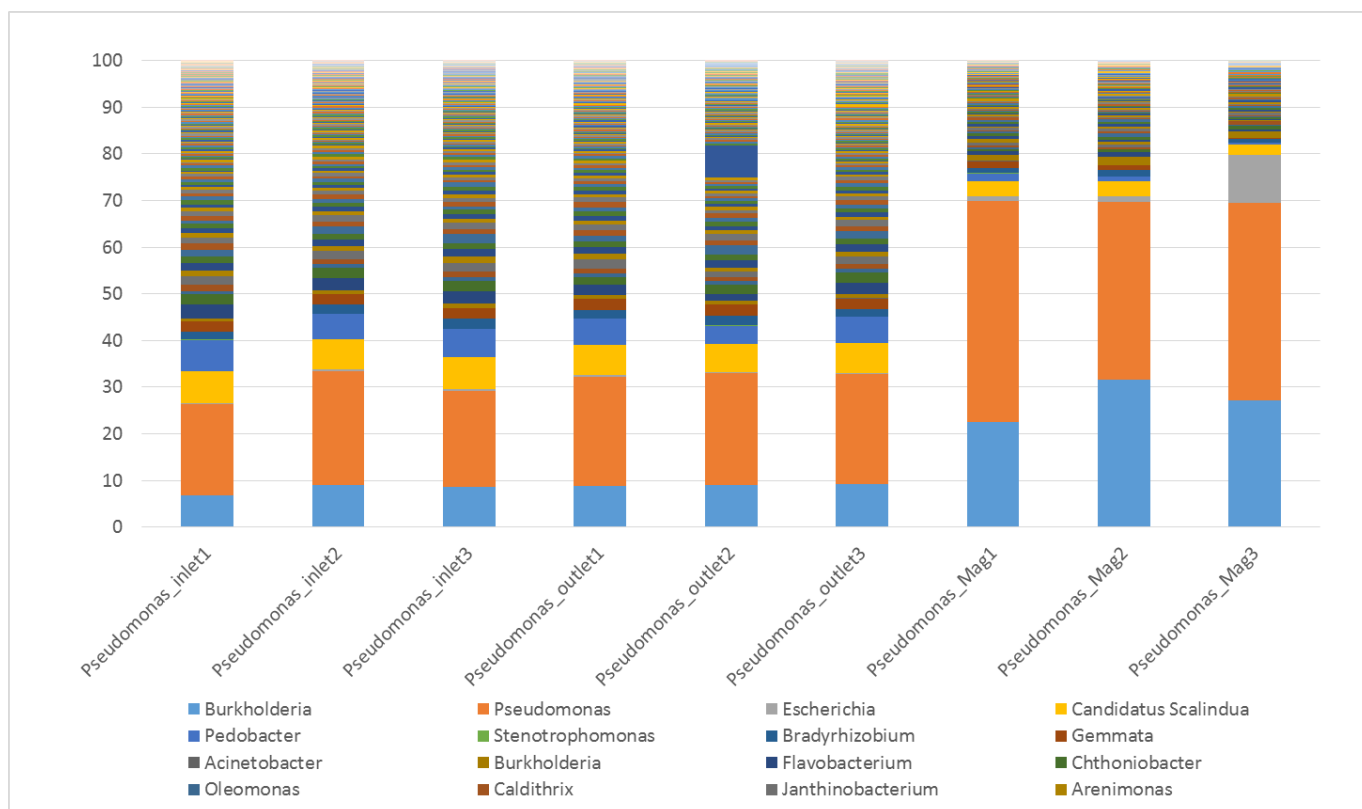


Figure 54 : Abondance relative des séquences annotées au niveau du genre sur des échantillons de sol triés avec un marquage de type HCR ciblant Pseudomonas putida.

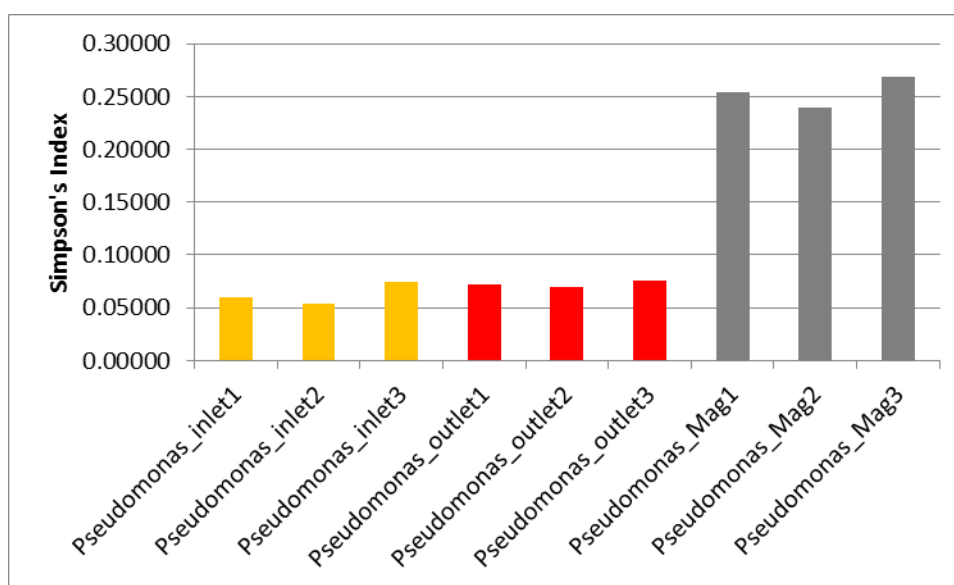


Figure 55 : Indice de Simpson calculé pour les différentes fractions récoltées sur des échantillons marqués par HCR. Les fractions magnétiques récoltées ont un indice de Simpson plus élevé que les fractions d'entrée et non magnétique témoignant d'une diversité réduite dans les fractions magnétiques.

La fraction n°2 (cellules non retenues), présente également un niveau de diversité élevé et une forte similitude des taxa détectés avec ceux identifiés dans la fraction n°1. Les indices de biodiversité entre bactéries dans les fractions 1 et 2 sont proches (indice de Simpson ~ 0.05) (cf. figure 55) sans claire distinction comme le confirment également les analyses en composante principale (cf. figure 56) où les fractions 1 et 2 forment un groupe compact.

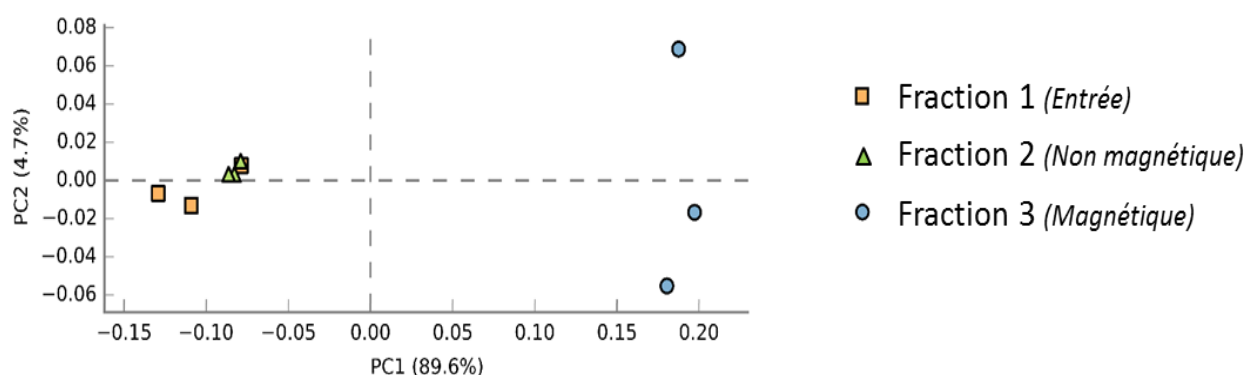


Figure 56 : Analyse en composante principale sur les données 16S des différentes fractions obtenues après un marquage de type HCR sur un sol enrichi avec *Pseudomonas putida*. Les échantillons des fractions magnétiques (3) se distinguent clairement du reste des échantillons qui forment un groupe bien défini (1 et 2).

Les bactéries détectées dans la fraction 3 sont en théorie celles qui ont été marquées magnétiquement lors de l'hybridation. L'analyse taxonomique des données de séquences révèle une différence de composition avec le microbiote des fractions 1 et 2. Le niveau de diversité y est également moindre (indice de Simpson ~ 0.25). Les fractions magnétiques présentent des profils de diversité avec deux genres bactériens très majoritairement représentés : les *Pseudomonas* pour environ 40 % des annotations et *Burkholderia* pour environ 25 %. Les quelques 70 % des séquences annotées à partir des fractions magnétiques que représentent ensemble ces deux genres indiquent la sélection de ces cellules bactériennes par le traitement car elles n'en représentaient que 25-30 % dans la fraction 1, résultat confirmé par l'analyse ACP qui sépare clairement ces échantillons de ceux des fractions 1 (entrée) et 2 (bactéries non hybridées).

Une tentative d'explication de l'accroissement du pourcentage de cellules affiliées à *Burkholderia* dans la fraction 3 a été recherchée dans la similarité de séquences entre la sonde (Ppu) et le génome de ces souches bactériennes. A cette fin a été utilisé l'outil *Testprobe*

disponible sur le site Silva qui permet d'identifier les cibles potentielles d'une sonde mais qui en l'occurrence a révélé que les 215 correspondances (match) de la sonde Ppu appartiennent exclusivement au genre *Pseudomonas*. D'après cet outil l'hypothèse d'une similitude de séquences entre sonde *Pseudomonas* et génomes de *Burkholderia* semble devoir être réfutée. Pourtant, l'utilisation du logiciel Blast (site du NCBI) qui permet de comparer une séquence requête (la sonde Ppu) aux séquences disponibles dans une base de données (en l'occurrence divers génomes de *Burkholderia*) révèle des niveaux de similarité atteignant de 80 à 93 % (dont certains sont identifiés comme affilié au 23S) en dépit d'un éloignement phylogénétique de bactéries classées les unes parmi les gammaprotéobactéries (Pp), les autres parmi les betaprotéobactéries (*Burkholderia*). S'il venait à se confirmer qu'un niveau élevé de similarité de séquences entre sondes et cibles est responsable de l'enrichissement en cellules de *Burkholderia* dans les fractions magnétiques, de nouvelles conditions d'hybridation devraient être définies de façon à en accroître la spécificité.

L'analyse du profil taxonomique des bactéries non cibles composant les fractions n°1 et 3 révèle que celles-ci sont composées des mêmes phyla et ce dans des proportions relativement proches à l'exception des protéobactéries dont l'abondance s'accroît de 46,8 % (fraction 1) à 65,9 % (fraction 3) des séquences annotées, cette différence étant à mettre au compte de l'accroissement des *Burkholderia* (une betaprotéobactérie) et des Bactéroidetes qui diminuent de 10,5 % (fraction 1) à 4,14 % (fraction 3). Les bactéries des autres phyla sont présentes dans des abondances similaires entre les deux fractions avec les Acidobactéries ($\approx 5\%$), les Plantomycetes ($\approx 4.5\%$), les Actinobactéries ($\approx 4\%$), les Firmicutes ($\approx 1.2\%$), les Chlorofexii ($\approx 1\%$) et les Cyanobactéries ($\approx 0.5\%$). L'intégration dans l'analyse ACP des bactéries non cibles issues des fractions 1 et 3 révèle cependant deux groupes distincts (cf. figure 57) dont l'origine est cependant directement reliée à l'évolution du nombre des cellules de *Burkholderia*. Comme pour le marquage par l'approche MISH, le protocole HCR n'a pas permis de fortement discriminer au sein du microbiote indigène initial pour en sélectionner les bactéries susceptibles de répondre positivement à l'hybridation du fait d'une proximité phylogénétique forte avec la bactérie ayant fourni la séquence de la sonde.

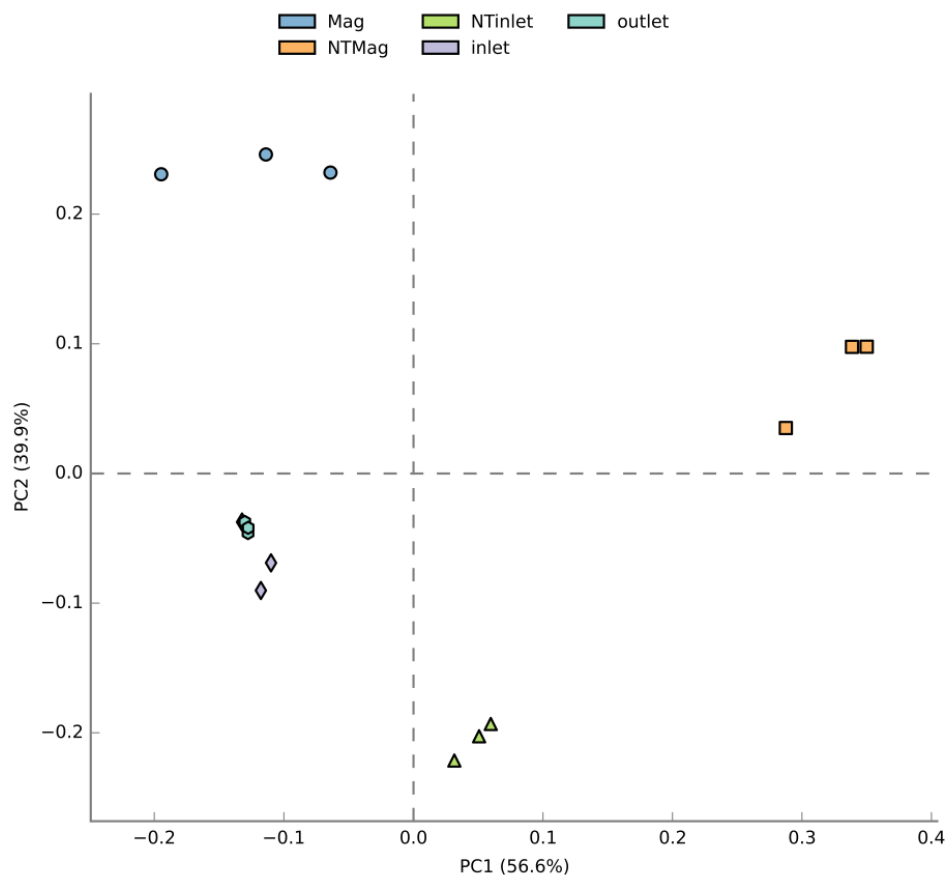


Figure 57 : Analyse ACP des résultats d'annotation sur des échantillons marqués par HCR ainsi que les données sur les bactéries non-cibles (extraites des fractions 3 (magnétique) et des fractions 1 (entrée)).

Mag = bactéries récoltées magnétiquement ; **NTinlet** = bactéries non cibles présentes dans la fraction n°1 ; **outlet** = fraction n°2 ; **NTMag** = bactéries non cibles présentes dans la fraction n°3 ; **inlet** = fraction n°1. Les échantillons **NTMag** et **NTinlet** forment deux groupes bien distincts sur l'ACP et illustrent la différence de composition entre ces échantillons.

IV. Conclusions et Perspectives

L'objectif des travaux réalisés dans ce chapitre était de valider expérimentalement deux techniques de marquage magnétique de cellules bactériennes ciblées et d'en évaluer le potentiel spécifique. Les résultats obtenus peuvent être considérés comme positifs pour chacune des approches avec un changement dans la composition taxonomique des échantillons après le tri par rapport aux échantillons initiaux, avec en particulier une réduction du niveau global de diversité

bactérienne au profit de taxa ciblés. Toutefois, il apparaît clairement qu'à chacune des étapes incluant la préparation des échantillons, les procédures de marquage et les méthodes de tri des optimisations expérimentales sont nécessaires pour atteindre le niveau requis de spécificité et de sensibilité. Les résultats montrent aussi que l'ajout de bactéries cibles dans les échantillons, même si cette étape a permis de valider les principaux concepts n'est que peu informative sur la capacité des techniques à capturer des bactéries indigènes justifiant de cibler de prochaines expérimentations sur des microbiotes indigènes non amendés.

Les différences d'efficacité notées entre les deux techniques indiquent des niveaux de sensibilité manifestement disparates, ces limitations justifiant le développement d'expérimentations complémentaires pour optimiser les temps d'incubation (d'hybridation) ou la quantité de sondes utilisées. Ce dernier paramètre est particulièrement important dans le cas de l'approche HCR, la formation de la structure secondaire sur laquelle vont être greffées les nanoparticules étant directement corrélée à la concentration en sondes initiatrices.

Concernant le marquage de type MISH, les tests de captures sur des échantillons de sol ont donné les résultats les plus prometteurs justifiant d'optimiser les protocoles en vue d'une meilleure spécificité pour limiter l'occurrence des bactéries non cibles dans les fractions magnétiques et d'une sensibilité accrue pour y accroître le nombre de cellules cibles. A noter que très récemment, ces mêmes sondes ont été utilisées dans le cadre d'une étude concernant la capture d'entérocoques par cytométrie en flux sur des échantillons de fèces [234] permettant ainsi de récupérer suffisamment de bactéries cible pour en extraire une quantité d'ADN exploitable (PCR, qPCR).

Il est plus difficile de conclure sur le potentiel du marquage par HCR du fait d'une seule série d'échantillons interprétable. Cependant le design du marquage par HCR présente de nombreux avantages par rapport au marquage par des sondes de longue taille (meilleure spécificité, plus grande simplicité de synthèse, adaptabilité à de nombreuses cibles,...) quoique la sensibilité soit plus faible. La modification du protocole par un recours à plusieurs sondes non chevauchantes au niveau de la portion ciblée du génome à l'instar des techniques de capture de séquences d'ADN dans les metagénomés [235] pourrait sensiblement accroître la sensibilité de la HCR sans compromettre les autres paramètres (cf. figure 58):

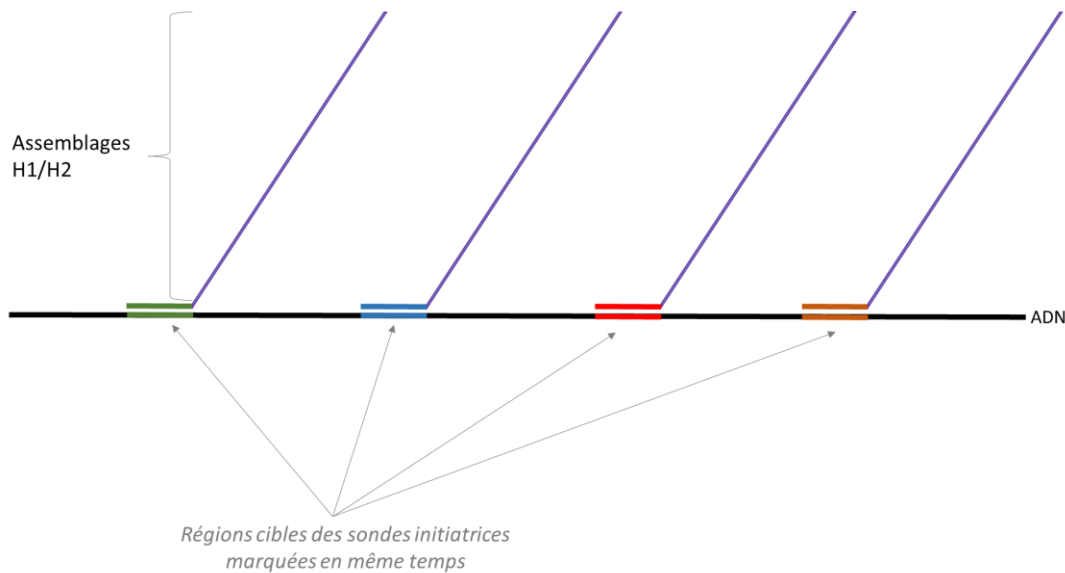


Figure 58 : Schéma illustrant le principe de l'utilisation en parallèle de plusieurs sondes initiatrices pour augmenter la sensibilité du marquage par HCR.

Les diverses sondes utilisées ciblent des portions différentes du génome qui ne se chevauchent pas permettant d'accumuler le nombre de structures secondaires (Assemblage H1/H2) présentes dans la cellule.

Enfin les optimisations se devront de considérer les dispositifs de capture magnétique pour les rendre plus opérationnels. Il a été montré que le tri séquentiel en deux temps imposé par le type de microsystèmes développés ici limite la taille des échantillons à traiter en raison d'une possible saturation des aimants. Les travaux décrits dans le prochain chapitre présentent le développement d'un dispositif de tri magnétique permettant le tri en continu des échantillons, qui devrait supprimer tout risque de saturation de l'aimant par les bactéries capturées.

Chapitre 4 : Développement d'un nouveau procédé de fabrication de dispositifs microfluidiques pour le tri magnétique

I. Introduction

Dans de nombreuses applications en lien avec le vivant, la capture spécifique d'entités biologiques telles que les cellules ou les acides nucléiques est un préalable à différentes études fondamentales ou diagnostics. Nous avons montré au chapitre 1 que les approches basées sur le magnétisme comportaient de multiples atouts, en particulier en termes de simplicité et de coût.

Dans le cadre de l'utilisation de la force magnétique pour capturer des cellules bactériennes marquées, un point essentiel est l'intensité des gradients de champs magnétiques que les aimants doivent générer pour permettre une attraction suffisante. Comme indiqué au premier chapitre, les aimants macroscopiques classiquement utilisés pour de nombreuses autres applications ne sont pas adaptés à l'attraction de cellules marquées avec des nanoparticules de faible diamètre du fait des faibles gradients qu'ils génèrent. Parmi les solutions ayant fait leurs preuves, nous avons cité le MACS® [104], dispositif développé par la société Miltenyi qui propose un gradient compatible avec l'emploi de nanoparticules superparamagnétiques et est préconisé pour le piégeage de cellules marquées avec des billes de 50 nm. Compte-tenu du fort intérêt pour les laboratoires sur puces, la tendance est néanmoins au développement de nouveaux systèmes microfluidiques pouvant intégrer, outre un module de tri, des modules de préparation de l'échantillon en amont et d'analyse ou de mesure en aval [236]. Dans le domaine des microsystèmes magnétiques la réduction d'échelle se révèle particulièrement avantageuse, puisqu'elle s'accompagne d'une augmentation du gradient de champ et donc des forces générées. Le contrôle de la cartographie du champ à l'échelle des objets manipulés permet également d'aller jusqu'au positionnement précis de cellules sur des microstructures magnétiques [185] ce qui rend possible les études sur cellules isolées [237] (*single-cell*). Toutefois, la haute technicité qui caractérise souvent ce type de dispositifs tend à limiter leur développement, la principale difficulté étant liée à la fabrication des structures magnétiques intégrées. Cette dernière fait généralement appel à des techniques de salle blanche telles que l'électrodéposition, la

pulvérisation cathodique ou encore l'évaporation thermique, relativement onéreuses et nécessitant une certaine expertise [238]. Ceci va à l'encontre des avantages précédemment cités en faveur du magnétisme (coût, simplicité) et tend à empêcher l'accès de ces technologies aux non-spécialistes, en particulier aux biologistes. Nous explorerons donc dans ce chapitre les possibilités offertes par les matériaux composites à base de polymères dopés avec des particules magnétiques, permettant de fabriquer des microtrieurs magnétiques avec peu d'équipements et à moindre coût.

Le système de tri microfluidique précédemment développé en collaboration avec l'Institut Néel et le G2Elab (voir Chapitre 1) et utilisé jusqu'à présent fonctionne en deux étapes : les bactéries cibles sont dans un premier temps attirées sur le réseau de micro-aimants situé en fond de canal, puis elles sont éluées dans un second temps grâce à l'augmentation du débit imposé.

Ceci tend à ralentir le traitement d'un échantillon et à limiter le nombre de bactéries pouvant être traitées à chaque étape, en raison du risque de saturation de la couche de bactéries formée sur les aimants. Une application en écologie microbienne visant un écosystème d'une très grande diversité comme le sol ne peut se concevoir que dans le cadre de dispositifs pouvant traiter un nombre très élevé de cellules bactériennes dans des délais raisonnables. Nous aborderons donc dans ce chapitre l'étude d'un dispositif permettant de réaliser le tri en flux continu de façon à accroître considérablement le volume des échantillons pouvant être traités. Après une brève présentation des structures classiquement rencontrées dans la littérature pour réaliser un tri en flux continu, nous décrirons le nouveau procédé de fabrication mis au point, ainsi que les premiers tests réalisés pour évaluer les performances des dispositifs ainsi obtenus.

II. Structures microfluidiques adaptées au tri sous flux continu

A. Etat de l'art

Dans son article intitulé « Continuous flow separations in microfluidic devices » [239], Nicole Pamme expose les avantages de la séparation sous flux continu. Parmi ceux-ci nous pouvons citer :

- L'introduction de l'échantillon en continu, permettant de traiter a priori n'importe quel volume d'échantillon
- L'évaluation en temps réel de l'efficacité de séparation : dans la mesure où la séparation peut être surveillée en continu, les paramètres de tri (notamment le débit) peuvent être ajustés en cours de traitement et leurs effets instantanément évalués, ce qui permet une plus grande réactivité et une mise au point plus rapide des conditions optimales
- La séparation latérale des différents constituants de l'échantillon (cf. figure 59) : Les différentes sous-populations à trier sont réparties dans la largeur du canal, perpendiculairement à la direction du flux, sous l'effet du champ de force appliqué (dans notre cas la force magnétique), ce qui permet de les acheminer vers différentes sorties.
- L'amélioration du potentiel d'intégration : l'étape de tri peut être plus facilement combinée avec des étapes de prétraitement en amont ou d'analyse en aval, ce qui permet de se rapprocher du concept de laboratoire sur puce.

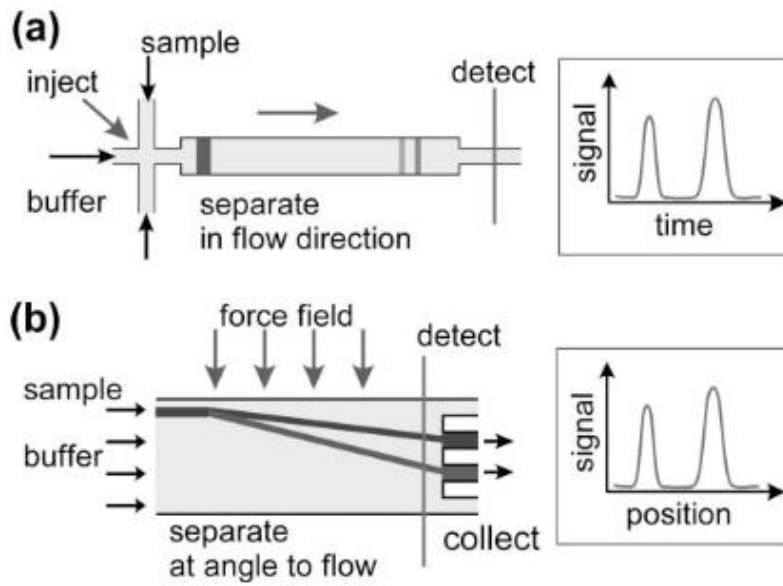


Figure 59 : Principe général de séparation dans un système microfluidique : a) Séparation de type "batch" : le volume introduit est limité et l'efficacité de séparation est évaluée en fin de traitement. b) Séparation sous flux continu.

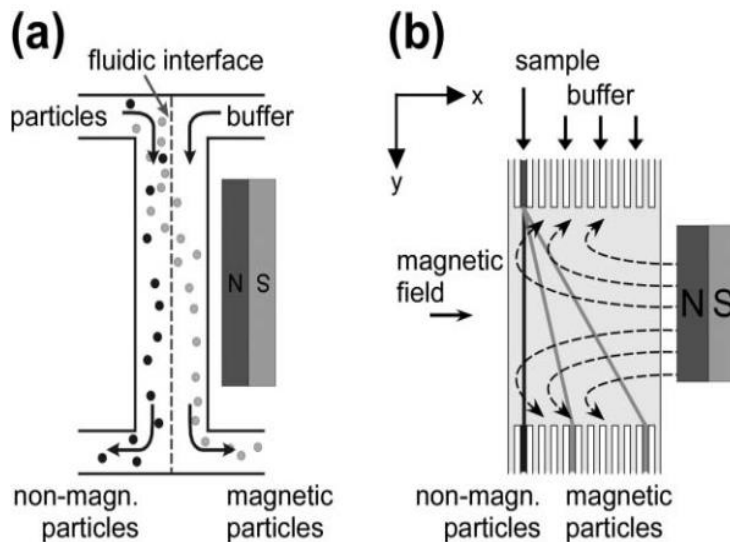


Figure 60 : Séparation d'entités magnétiques et non magnétiques en continu sous l'action d'un champ non homogène généré perpendiculairement à la direction du flux. [240]. A : Séparation dans un microcanal en T, permettant d'acheminer les particules magnétiques.

La figure 60 illustre le principe du tri magnétique sous flux continu : le dispositif utilisé est constitué d'une chambre dans laquelle l'échantillon injecté en continu est soumis à des forces magnétiques s'exerçant selon un angle déterminé (pouvant aller jusqu'à 90°) par rapport à la direction du flux. Les particules non magnétiques ne sont pas déviées par le champ et restent dans leur ligne d'écoulement initiale. Les particules magnétiques sont déviées vers l'aimant, ce qui permet de les transférer dans une autre voie d'écoulement les conduisant vers une autre sortie de collecte. La déviation latérale est moins importante lorsque le débit augmente. Le champ magnétique est typiquement généré par un aimant permanent placé sur le côté de la chambre fluïdique. Ce principe exploitant les écoulements laminaires et basé sur l'emploi de dispositifs multi-entrées et multi-sorties a notamment été décrit par Blankenstein dès 1998 [241].

Les performances de ces dispositifs de tri magnétique en flux continu sont améliorées par le recours à des solutions hybrides associant un aimant permanent situé à l'extérieur du dispositif avec des structures magnétiques intégrées à base de ferromagnétiques doux placées à proximité immédiate du microcanal [242].

Les gradients de champ ainsi générés sont beaucoup plus élevés, ce qui permet une capture plus efficace des cellules marquées magnétiquement. Ces structures peuvent être positionnées de différentes manières par rapport à la chambre fluïdique, comme illustré sur la Figure 61. Xia et collaborateurs ont ainsi proposé un microsystème en forme de double Y, intégrant des microstructures dentées en NiFe situées à une distance de 100 μm de la chambre fluïdique [243]. Les auteurs ont pu mettre en évidence des performances de capture intéressantes en réalisant le piégeage de 90 % des cellules d'*Escherichia coli* introduites dans le canal à un débit de 30 $\mu\text{l/h}$, ces cellules ayant été préalablement immuno-marquées avec des particules de 130 nm. Ces travaux font suite à ceux de Inglis en 2004 [206], qui introduisit au fond d'un microcanal un réseau de bandes parallèles en nickel (2 μm d'épaisseur, 10 μm de largeur) inclinées de 10° par rapport à la direction de l'écoulement. L'aimantation de ces microstructures était assurée par l'application d'un champ extérieur de 0,08 T. Ce dispositif a été employé pour le tri de cellules du sang : les leucocytes marqués avec des nanoparticules superparamagnétiques de taille comprise entre 20 et 100 nm ont pu être attirés puis déviés par ces bandes pour suivre une trajectoire différente des globules rouges non marqués. Ce concept développé par Inglis fut repris plus tard en 2008 par Adams et collaborateurs [244] pour proposer une version plus élaborée

permettant de récupérer spécifiquement deux isolats différents d'*Escherichia coli* immuno-marqués avec des particules de différente taille (2.8 et 4.5 μm) et les différenciant d'un troisième isolat non marqué. Ces bactéries présentant différentes charges magnétiques sont acheminées vers les différentes sorties du dispositif grâce à des bandes ferromagnétiques inclinées selon différents angles comme l'illustre la figure 59 B

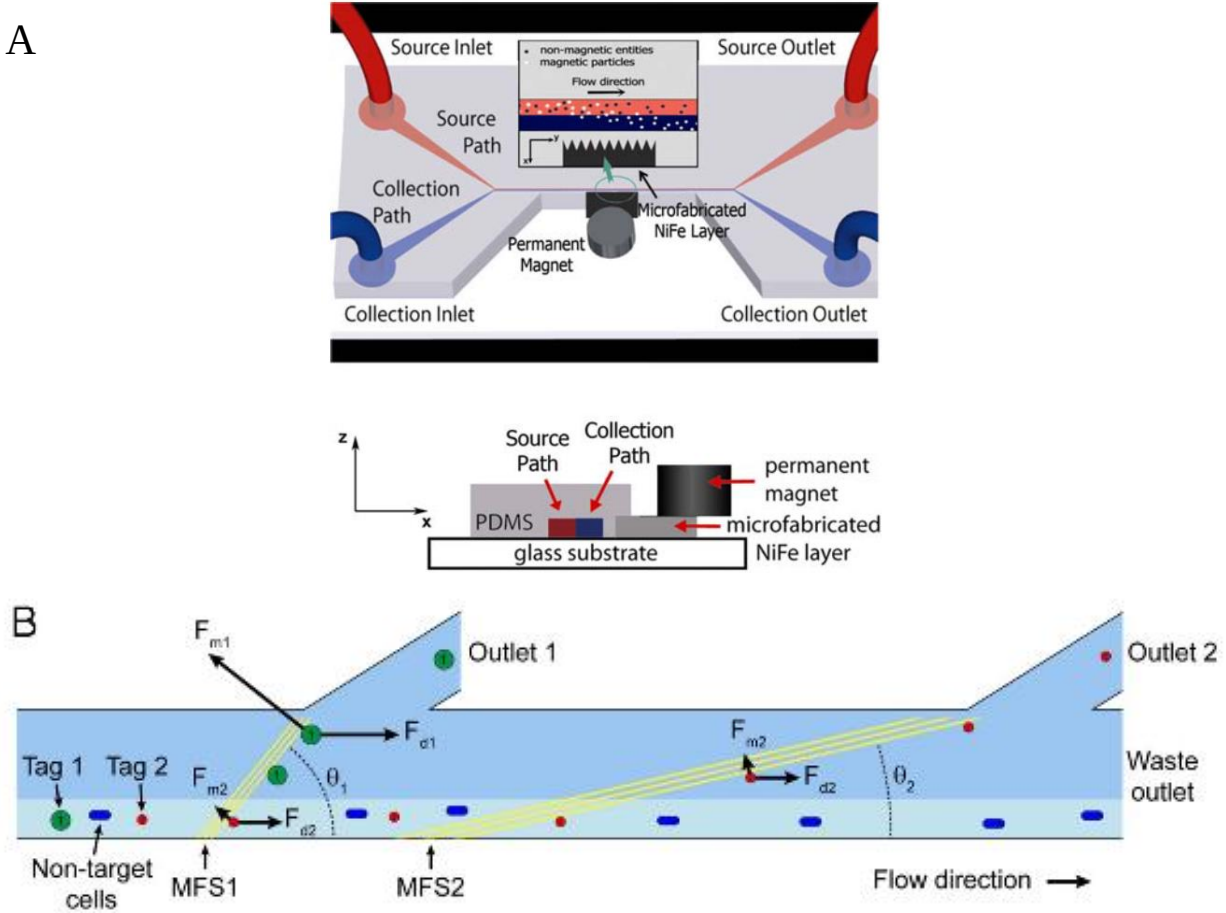


Figure 61 : Exemples de microsystèmes de tri en flux continu intégrant des structures en matériaux ferromagnétiques doux aimantées par une source de champ extérieure. A. Système proposé par Xia et al. [243] intégrant une structure dentée en NiFe sur le côté du canal (le gradient de champ, l'écoulement et la hauteur du canal sont respectivement dirigés suivants les axes x , y et z). B. Rails aimantés placés en fond du canal pour réaliser l'enrichissement de différents isolats d'*Escherichia coli* (d'après [244]), suivant un concept proposé par Inglis et al. [204].

B. Structure du microsystème développé

Le système microfluidique que nous présentons dans ce chapitre reprend le concept proposé par Inglis. Son principe est décrit dans la figure 62. L'originalité de notre approche réside dans l'emploi de PDMS dopé avec des particules magnétiques pour la réalisation du réseau de bandes inclinées.

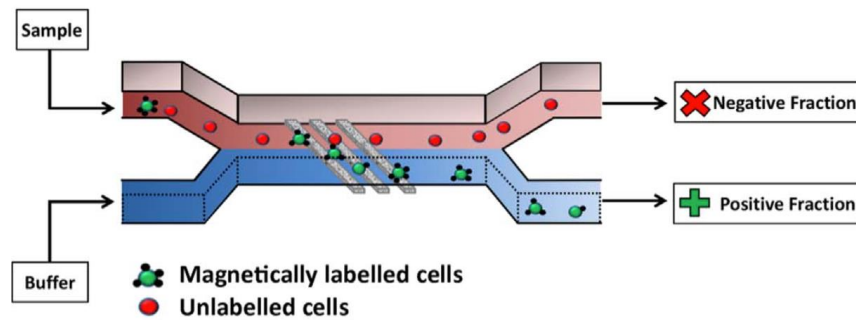


Figure 62 : Structure du microsystème développé. Les bandes magnétiques situées en fond de canal sont réalisées en matériau polymère nanocomposite.

Le microsystème développé est constitué d'une chambre fluide en double Y (microcanal à deux entrées et deux sorties) intégrant à sa base des bandes magnétiques permettant d'extraire spécifiquement les bactéries marquées magnétiquement de la ligne d'écoulement dans laquelle circule l'échantillon vers une autre ligne dans laquelle circule un tampon « propre ». Ceci doit permettre de séparer les bactéries cibles marquées par hybridation *in situ* magnétique des autres bactéries non cibles au sein d'un échantillon complexe.

Compte-tenu de la faible taille des nanoparticules employées pour le marquage des bactéries, il s'est avéré nécessaire d'assurer le positionnement des structures magnétiques au plus proche du canal microfluidique afin de limiter les pertes d'attraction liées à la distance. Par ailleurs, nous avons souhaité reproduire la structure plane présentée par les réseaux de micro-aimants employés jusqu'à présent, afin de limiter les obstacles pouvant entraver la circulation des bactéries dans le dispositif. La technique de microfabrication développée, présentée dans la partie III de ce chapitre, respecte ces deux contraintes, dans la mesure où elle permet la réalisation de réseaux de bandes magnétiques affleurant avec la surface.

C. Identification des forces en jeu

Dans un dispositif de tri magnétique sous flux continu tel que décrit ci-dessus, les particules magnétiques sont soumises à différentes forces définissant leur trajectoire. Les interactions entre particules sont généralement négligées, et l'on ne considère que les trois forces suivantes :

- La force de magnétophorèse, déjà présentée au chapitre 1, pouvant s'écrire de la manière suivante dans le cas d'une particule saturée :

$$\vec{F}_m = \frac{4}{3}\pi r^3 \mu_0 \frac{M_s}{|\vec{H}|} (\vec{H} \cdot \nabla) \vec{H} \quad (\text{Eq.5})$$

Avec M_s le moment magnétique à saturation de la particule, r son rayon et $\vec{H}$ le champ magnétique au centre de la particule.

- La force de gravité :

$$\vec{F}_g = \frac{4}{3}\pi r^3 \vec{g} (\rho_{\text{particule}} - \rho_{\text{fluide}}) \quad (\text{Eq.6})$$

Cette expression tient compte de la poussée d'Archimède subie par la particule immergée dans le fluide, opposée à son poids. $\vec{g}$ désigne l'accélération de la pesanteur et $\rho_{\text{particule}}$ et ρ_{fluide} les masses volumiques respectives de la particule et de son milieu d'immersion

- La force de traînée (*drag*), également appelée force de Stokes, exercée par le fluide :

$$\vec{F}_d = -6\pi\eta r (\vec{V}_{\text{particule}} - \vec{V}_{\text{fluide}}) \quad (\text{Eq.7})$$

Où $\vec{V}_{\text{fluide}}$ et $\vec{V}_{\text{particule}}$ sont les vitesses respectives du fluide et de la particule magnétique et η la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s)

D'après la deuxième loi de Newton, le bilan des forces exercées sur une particule magnétique est donc le suivant :

$$\frac{4}{3}\pi r^3 \rho_{\text{particule}} \frac{d\vec{v}_{\text{particule}}}{dt} = \vec{F}_{\text{mag}} + \vec{F}_{\text{drag}} + \vec{F}_g \quad (\text{Eq.8})$$

Les différentes forces en jeu sont représentées figure 63 dans le cas de rails magnétiques (dans le plan des rails). La composante verticale $\vec{F}_{mz}$ de la force magnétique attire la particule magnétique vers la surface des rails.

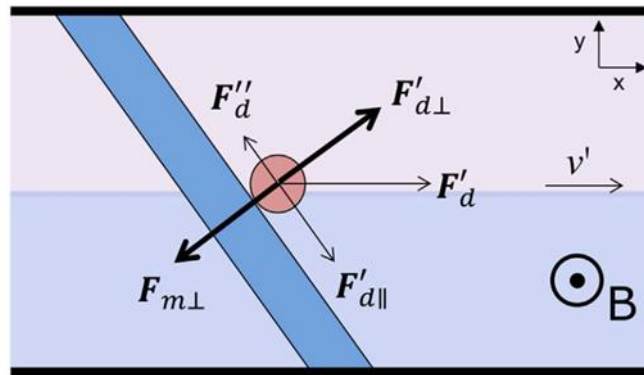


Figure 63 : Identification des forces en jeu (projection dans le plan des rails magnétiques). Le piégeage des billes magnétiques le long des rails est possible dans le cas où la composante de la force magnétique perpendiculaire au rail $F_{m\perp}$ est plus grande que celle de la force de drag $F'_{d\perp}$. Le guidage de la particule le long du rail est alors assuré par la composante $F'_{d\parallel}$ de la force de trainée.

III. Fabrication du dispositif en PDMS composite magnétique

A. Le Polydiméthylsiloxane, un matériau de choix pour la microfluidique

Les premiers systèmes microfluidiques ont été principalement réalisés en silicium ou en verre, sur la base des technologies de fabrication déjà développées pour la microélectronique [245,246]. Cependant, d'autres types de matériaux, en particulier les polymères, ont depuis montré de nombreux avantages pour la microfluidique. Moins chers que le silicium, ils permettent aussi de travailler avec des processus de fabrication plus simples basés sur différentes techniques de moulage [247]. De nombreux polymères sont aujourd'hui employés pour la fabrication de microsystèmes, parmi lesquels figurent le polyuréthane [248], le polycarbonate [249], le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) [250], le polystyrène [251] mais également le Polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce dernier constitue un matériau de prédilection pour le prototypage rapide de puces microfluidiques [252], compte-tenu de sa facilité de moulage, sa transparence, son caractère biocompatible, sa déformabilité ainsi que sa perméabilité aux gaz [253,254].

Le PDMS appartient à la famille des polysiloxanes. Il est composé de liaisons Si-O, dans lesquelles deux groupements méthyles (-CH₃) sont substitués sur l'atome de silicium pour donner la formule suivante : CH₃[Si(CH₃)₂O]_nSi(CH₃)₃, n étant le nombre de répétitions du monomère. La fabrication de dispositifs en PDMS repose sur la technique de lithographie douce, consistant à mélanger le PDMS liquide à un agent réticulant avant de le verser sur un moule micro-structuré dont il prendra l'empreinte après polymérisation sous chauffage. Le moule est typiquement fabriqué en résine photosensible, telle que la résine SU8 employée dans le cadre de nos travaux (cf. figure 64).

Après démoulage, cette pièce est percée à l'aide d'un poinçon afin de permettre l'ajout ultérieur de connexions microfluidiques entre le microcanal et l'extérieur. Le canal formé dans le PDMS est scellé avec une lame de verre, un autre bloc de PDMS ou un support en silicium par exemple. Un collage irréversible peut être obtenu par traitement avec un plasma d'oxygène (ou un simple plasma d'air) [255]. Sous l'effet du plasma, les groupements méthyles de surface sont progressivement remplacés par des groupements hydroxyles (-OH) pour former des silanols (Si-OH). Il en est de même pour le verre et le silicium et si les deux surfaces à coller sont exposées à ce plasma puis rapidement mises en contact, des liaisons covalentes -O-Si-O- sont créées pour produire un collage de qualité [256] (cf. figure 65).

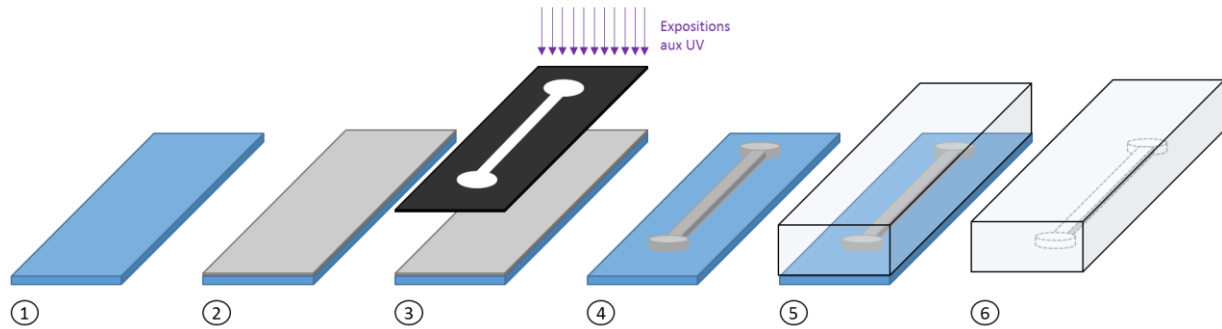


Figure 64 : Fabrication d'un canal microfluidique en PDMS par lithographie douce.

Sur une lame de verre (1), une résine photosensible est étalée par centrifugation afin d'obtenir une couche de quelques dizaines de μm d'épaisseur (2). La résine (ici négative) est ensuite exposée aux UV à travers un masque définissant la géométrie du canal (3). Après développement des parties non insolées, un moule (ou « master ») présentant en négatif les structures souhaitées est obtenu (4). Le moule est ensuite recouvert de PDMS mélangé à l'agent réticulant (5). Après polymérisation, le morceau de PDMS devenu solide est démoulé et comporte l'empreinte du master à sa base (6).

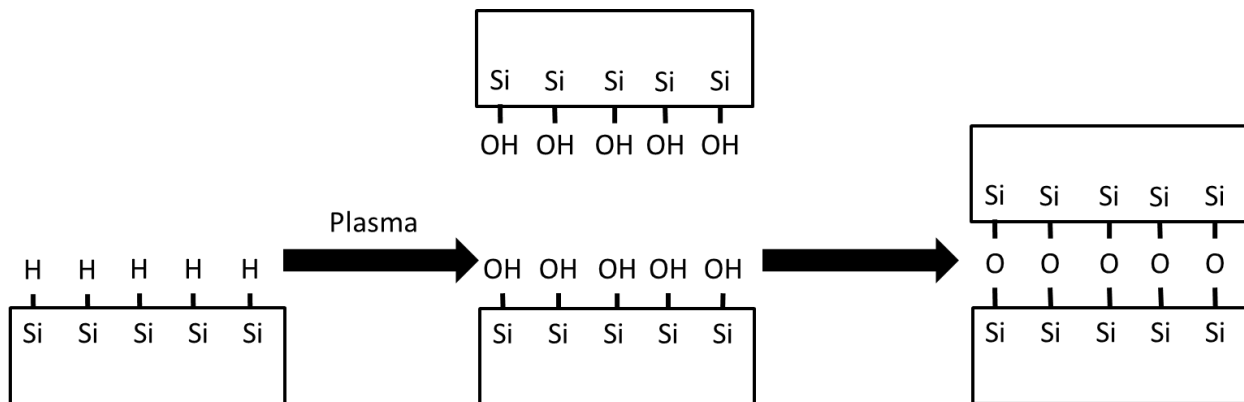


Figure 65 : Représentation schématique de la formation de groupements silanols sur des substrats (verre, PDMS, silicium...) par traitement plasma, permettant le scellement de la puce microfluidique.

B. Les matériaux polymères composites magnétiques

1) Avantage des polymères composites

Les polymères présentent de nombreux avantages pour la microfluidique et les MEMS par rapport à d'autres matériaux, tels que leurs propriétés mécaniques adaptables (rigidité, flexibilité, élasticité) ainsi que la simplicité et le faible coût des procédés de fabrication associés, autorisant un très large éventail de formes et de tailles et facilitant l'accès des techniques employées aux non-spécialistes. Ils peuvent également servir de matrice pour la fabrication de matériaux composites. Ils sont dans ce cas associés à un dopant (nanoparticules ou poudres conductrices, magnétiques, etc.) leur conférant de nouvelles propriétés. Ces polymères composites peuvent solutionner certains problèmes d'intégration et de compatibilité des matériaux conducteurs ou magnétiques dans les dispositifs microfluidiques à base de polymères et faciliter l'obtention de systèmes étanches et biocompatibles. Ils permettent par exemple de fabriquer aisément des électrodes épaisses [257], mais également des micro-valves, des mélangeurs, etc. [213]. Ils sont obtenus par ajout dans le prépolymère de micro-ou nanoparticules magnétiques disponibles commercialement dans une très large gamme de compositions et de tailles. Parmi les polymères les plus utilisés comme matrice, on peut citer notamment les photopolymères tels que la SU8 [258] ou les élastomères micro-moulés comme le PDMS [259–261], ayant permis la réalisation de microsystèmes fonctionnels.

2) Choix des matrices et dopant employés

Le trieur de cellules développé dans le cadre de cette thèse comporte des microstructures réalisées en PDMS magnétique. Le choix du PDMS comme matrice permet d'assurer une bonne compatibilité entre le polymère non dopé formant le microcanal et les structures magnétiques intégrées en fond de canal. Ce choix nous permettra notamment de procéder à un scellement du dispositif par collage PDMS-PDMS.

Des particules magnétiques seront alors mélangées au PDMS (prépolymère + agent réticulant) pour lui conférer les propriétés souhaitées. Les composites magnétiques sont obtenus à partir de micro ou nano particules en matériaux ferromagnétiques doux (Ni, Fe, Co, oxydes de fer) ou de matériaux durs de la famille des terres rares (SmCo, NdFeB...) [213]. Dans ce dernier cas, les

particules magnétiques employées ont une taille typiquement supérieure à 1 μm . En vue de faciliter la dispersion des particules qui tendent à s'agglomérer, le recours à un solvant est également possible. Les particules magnétiques sont généralement de forme sphérique ou plus aléatoire quand elles sont obtenues par broyage de matériaux magnétiques. Deux types de particules ont été utilisées dans le cadre de nos travaux : des particules de Fer Carbonyle (Sigma) de forme sphérique et de taille comprise entre 0.5 et 7 μm (cf. figure 66) et des particules de Néodyme Fer Bore (NdFeB) de taille moyenne 5 μm , obtenues par broyage mécanique et présentant donc une forme plus irrégulière (MQFP-B, Magnequench International). Ces deux catégories de particules permettent de répondre à deux types des besoins : les premières, constituées de matériau magnétique doux, sont aimantées seulement en présence d'une source de champ externe. Ceci permet d'annuler facilement le champ magnétique ou de moduler l'intensité du champ appliqué si cela est souhaité. Les secondes, composées de matériau ferromagnétique dur, peuvent être aimantées de façon permanente, ce qui permet alors de s'affranchir de l'utilisation d'une source externe et de réaliser ainsi des dispositifs autonomes et plus compacts.

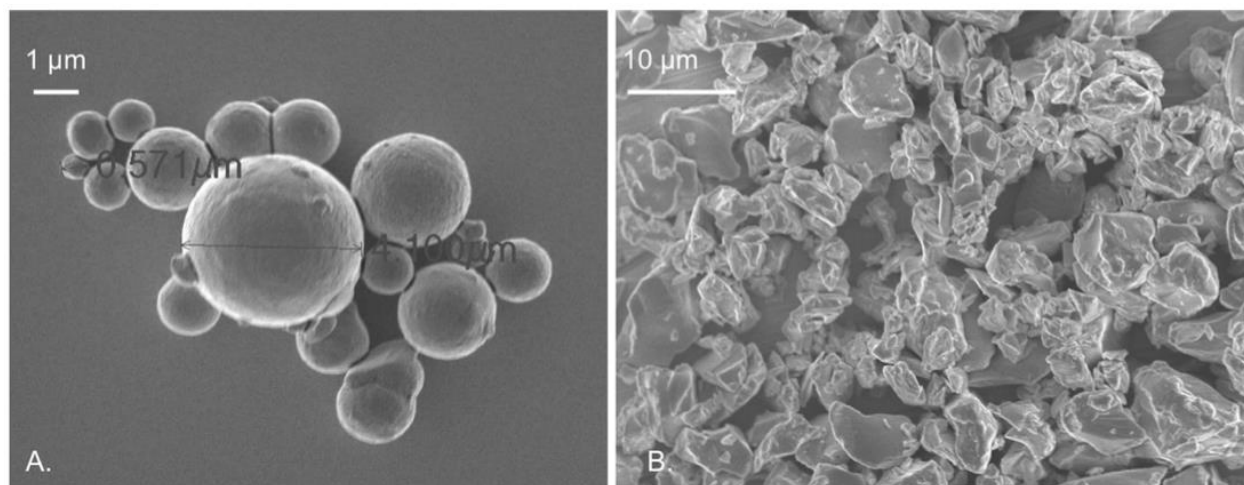


Figure 66 : Observation en microscopie électronique à balayage des particules de Fer Carbonyle (A) et NdFeB (B) utilisées dans le cadre de nos travaux.

Les performances des structures en PDMS magnétique (mais aussi à base d'autres polymères composites) vont dépendre de leur géométrie ainsi que de la proportion matrice PDMS/ particules (exprimée en pourcentage massique). Toutefois, un compromis doit être trouvé expérimentalement sur la proportion de particules magnétiques à intégrer dans le PDMS afin de

générer le champ magnétique le plus élevé possible sans compromettre la flexibilité du dispositif ni les capacités de polymérisation et de structuration

C. Structuration et intégration de PDMS magnétique

1) Approche “Doctor-Blade”

L’une des méthodes les plus couramment employées pour la fabrication de structures en PDMS magnétique intègre une étape d’étalement sur un moule, suivant l’approche « *doctor-blade* » [260,262–264]. Le moule est classiquement réalisé en résine photosensible comme la SU8 (cf. figure 67). Les parties creuses du moule sont remplies de PDMS magnétique, l’excédent étant éliminé par raclage avant ajout de PDMS non dopé sur l’ensemble de la structure. Après polymérisation de l’ensemble en étuve, le bloc de PDMS démoulé arbore à sa surface les structures magnétiques dont la topologie a été définie par la forme du moule.

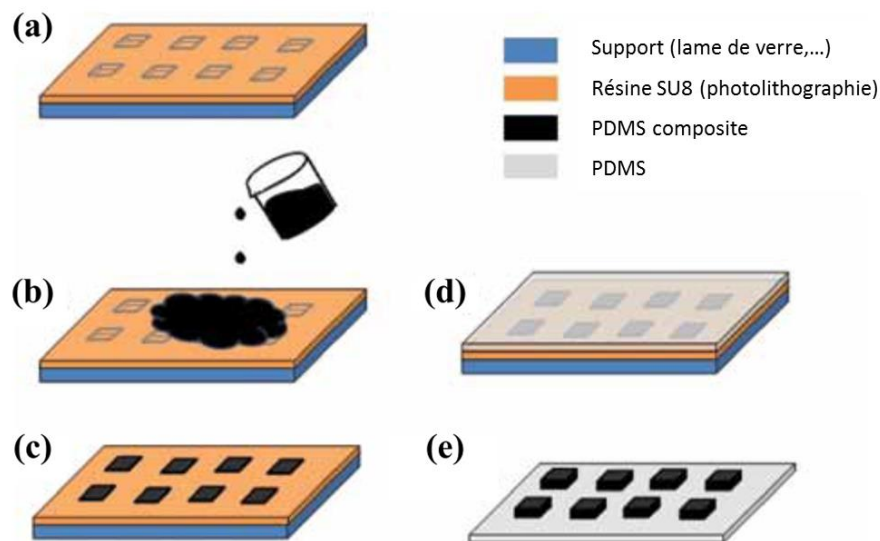


Figure 67 : Approche « doctor blade » pour la fabrication de microstructures en PDMS composite.

Cette technique se base sur l’emploi d’un moule, fabriqué par exemple en résine photosensible (a) le PDMS composite est étalé (b) afin de remplir les cavités. L’excès de PDMS dopé est éliminé de la surface par raclage (c) puis la structure est recouverte de PDMS (d). Après polymérisation, le bloc peut être démoulé (e). Les structures magnétiques sont solidaires du socle en PDMS.

Ce processus de fabrication a par exemple été utilisé par Mustin et collaborateurs pour réaliser des électrodes 3D avec du noir de carbone [261], puis par Faivre et collaborateurs [260] pour intégrer des piliers en PDMS dopé avec du Fer carbonyle dans une chambre fluide. Les structures en matériau doux de 50 à 500 μm , aimantées par deux macro-aimants placés de part et d'autre du microcanal, permettent d'augmenter les gradients de champ au niveau des plots magnétiques.

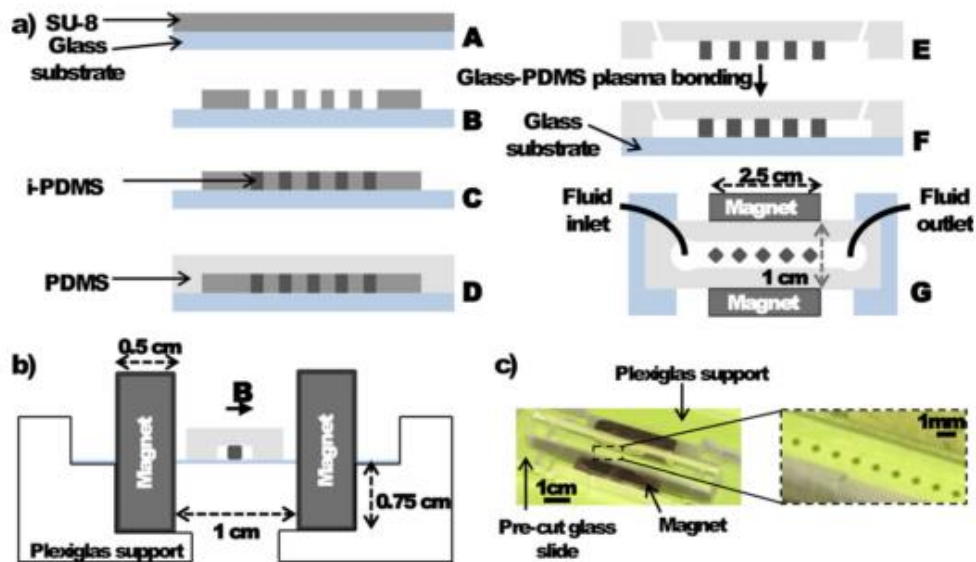


Figure 68 : Intégration de piliers magnétiques dans un microcanal par l'approche « doctor blade » (d'après [260]).

Cette approche est cependant délicate, car il est difficile d'enlever la totalité du PDMS dopé en excès lors de l'étape de raclage. L'obtention d'une surface parfaitement propre est néanmoins possible au prix d'étapes de traitement supplémentaires reposant sur l'emploi de couches sacrificielles [263].

Par ailleurs, comme indiqué précédemment, nous cherchons à obtenir des microstructures magnétiques intégrées dans un bloc de PDMS, et affleurant avec la surface de ce bloc, afin de faciliter la circulation des bactéries dans le microsystème et le collage du canal. A l'issue du procédé décrit à la figure 67, nous aboutissons à la configuration décrite à la figure 69a. Une

étape de planarisation est donc nécessaire pour s'affranchir des motifs topographiques et aboutir à la structure décrite figure 69b.

A l'issue de l'étape de planarisation, les structures magnétiques sont néanmoins recouvertes d'une couche de PDMS résiduelle dont l'épaisseur peut difficilement être réduite en deçà d'une dizaine de micromètres. Plusieurs solutions ont notamment été étudiées dans la thèse de L. Zanini [265] pour le cas d'aimants topographiques en NdFeB réalisés sur silicium (ex : ajout d'un poids au-dessus du dispositif ou d'un aimant en dessous de la boîte de Pétri lors de l'étape décrite à la figure 67c.). Plecis et collaborateurs [266] ont également proposé différentes approches pour graver cette couche de PDMS résiduelle, basées sur la gravure sèche par RIE (Reactive Ion Etching) ou humide à partir d'un mélange de n-méthyl-2-pyrrolidone et de tetrabutylammonium fluoride.

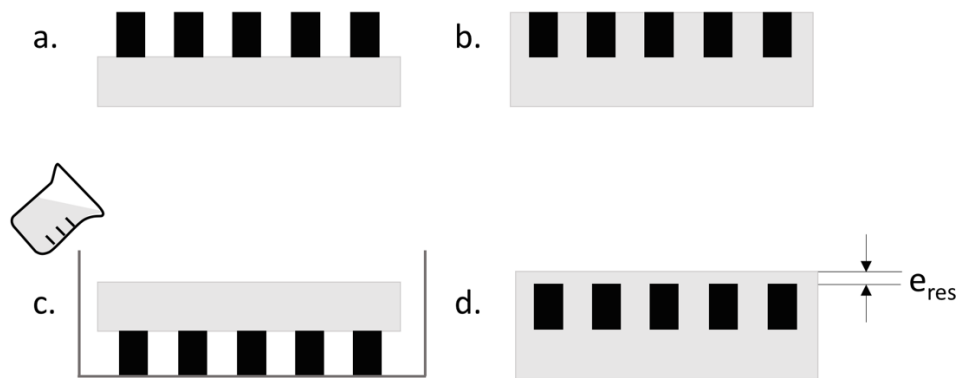


Figure 69 : Etape de planarisation consécutive à l'obtention de piliers magnétiques en PDMS dopé (a. et b.). c. L'ajout de PDMS liquide (c.) permet d'intégrer les piliers dans un bloc de PDMS, mais il est resté à trouver une solution pour limiter l'épaisseur de PDMS résiduelle au-dessus des structures magnétiques.

2) Micro-moulage de PDMS composite par injection

Une autre méthode de structuration du PDMS magnétique a également retenu notre attention. Elle se base sur l'injection de PDMS dopé dans des microcanaux et s'inspire des travaux de Puttaswamy et collaborateurs, ayant intégré des électrodes épaisses dans des dispositifs microfluidiques en injectant un mélange de laque d'argent et de nanopoudre de carbone dans des microcanaux débouchant sur le canal principal (cf. figure 70) [267].

Nous avons cherché à évaluer cette approche en réalisant un dispositif intégrant des structures magnétiques placées sur le côté du canal principal (cf. figure 71). La plus grande difficulté est liée au fait qu'il est difficile de stopper la progression du PDMS dopé à l'endroit visé. Il est possible de jouer sur la viscosité du PDMS dopé qui dépend du ratio PDMS/particules magnétiques et de stopper plus rapidement le PDMS composite en plaçant le dispositif sur une plaque chauffante. Dans tous les cas, il est difficile d'obtenir des résultats reproductibles lorsque l'on cherche à remplir différents canaux voisins (cf. figure 71b).

Une approche alternative consistant à injecter le PDMS composite dans un canal non plus perpendiculaire mais parallèle au canal principal a été proposée par Siegel [268] et plus récemment par Zhou et collaborateurs [269]. Le canal servant de guide au PDMS magnétique peut être élargi localement pour permettre l'élaboration de structures arrondies ou pointues favorisant l'obtention de gradients de champs plus importants (cf. figure 72). Cependant, la distance séparant le canal en PDMS magnétique du canal principal est de l'ordre de plusieurs dizaines de μm . Ceci se traduit par une diminution des forces d'attraction exercées sur les entités biologiques marquées et donc par une baisse des performances du microsystème.

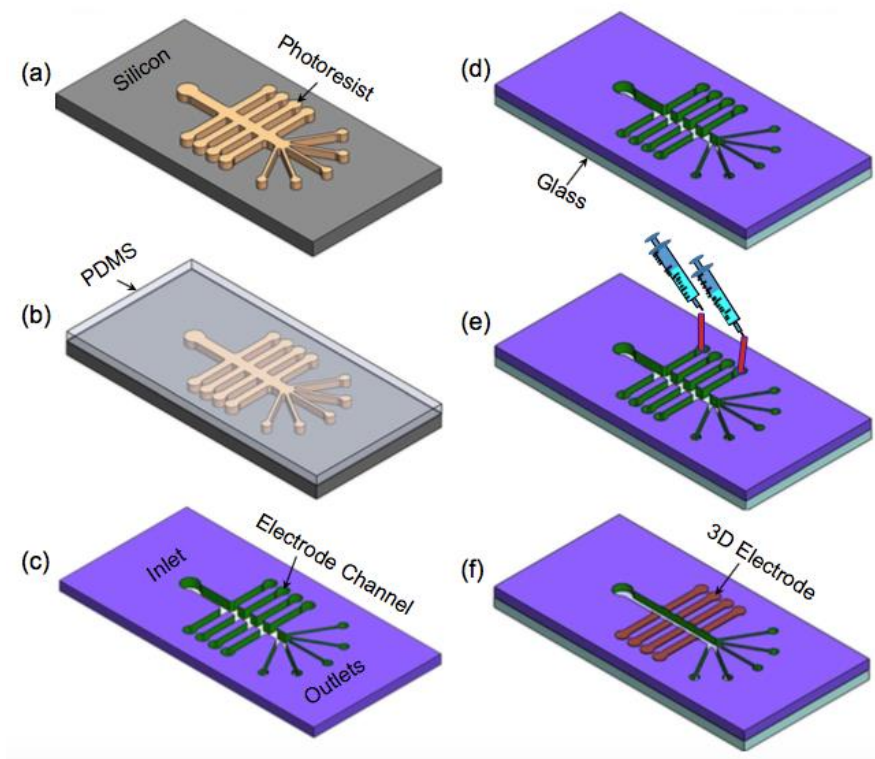


Figure 70 : Injection de matériau conducteur dans des microcanaux en PDMS pour la réalisation d'électrodes épaisses en vue du tri de particules par diélectrophorèse [267]

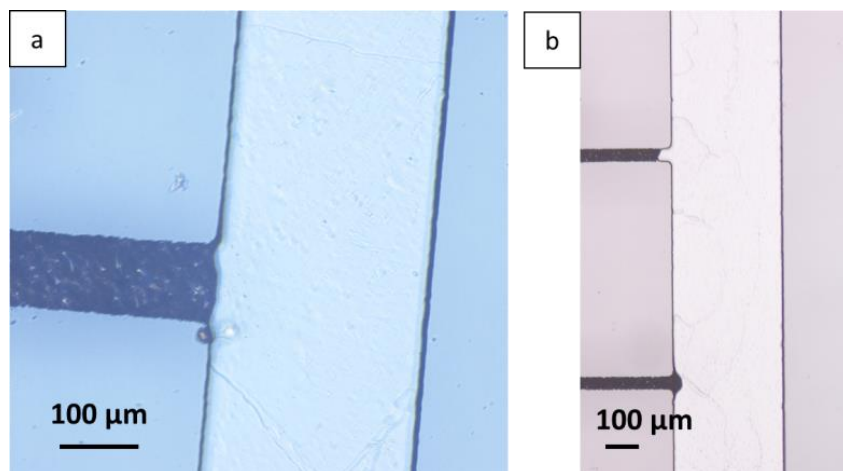


Figure 71 : Bande magnétique d'épaisseur 50 μm et de largeur 100 μm obtenue par injection de PDMS mélangé à des particules de Fer Carbonyle (80 %) dans un canal perpendiculaire au canal principal.

a) illustration d'un cas où le PDMS composite a pu être arrêté exactement au niveau du canal microfluidique b) illustration de la difficulté de reproductibilité de l'injection sur un même dispositif montrant que le PDMS composite ne migre pas exactement jusqu'au point désiré (cas le plus courant).

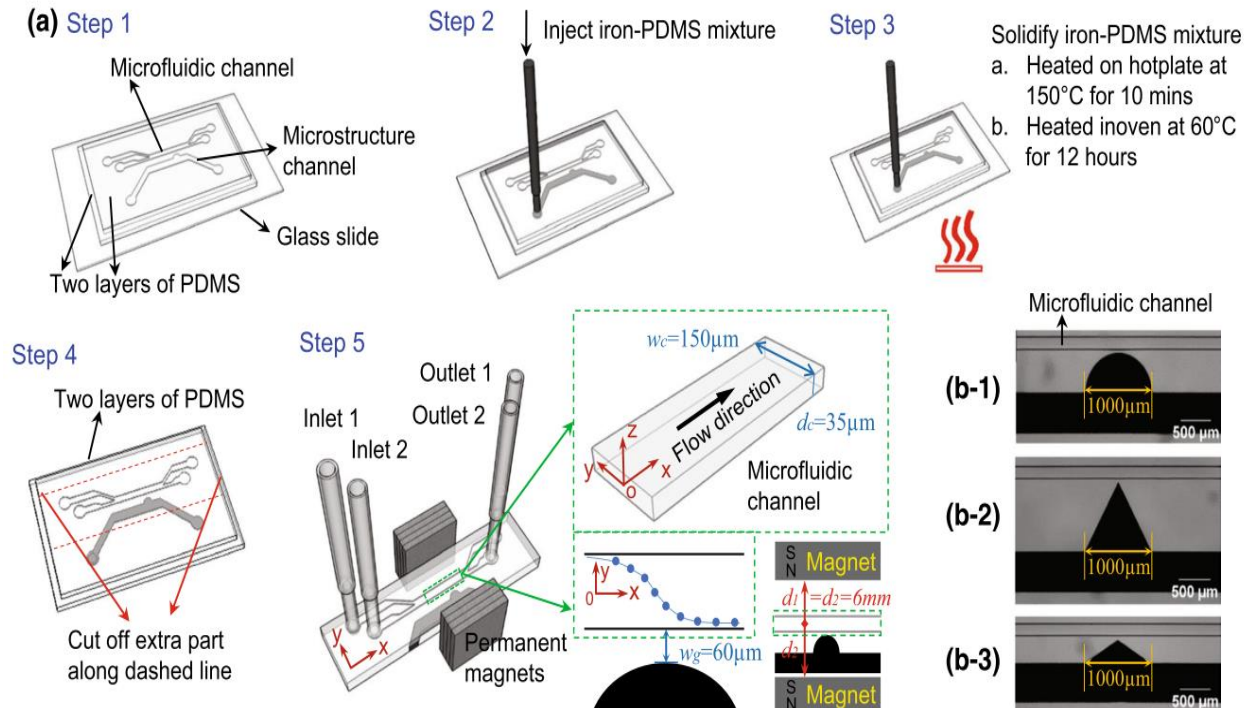


Figure 72 : Fabrication d'un microsystème magnétique par Injection de PDMS composite dans un canal parallèle au canal principal [269].

3) Approche proposée

L'approche proposée pour la réalisation du dispositif présenté au paragraphe **II.b** associe deux principes : le micro-moulage de PDMS composite par injection ainsi que l'étalement sur lame de verre d'une mince couche de PDMS servant d'interface pour le collage réversible PDMS/verre.

Ce second procédé doit cependant être présenté plus en détail. Comme mentionné plus tôt dans ce chapitre, le scellement irréversible des canaux en PDMS sur des supports en verre ou en silicium peut être réalisé aisément par traitement plasma (à oxygène ou air) visant à oxyder les surfaces à assembler et aboutissant à la formation de liaisons covalentes Si-O-Si. Ce type de scellement n'étant pas possible sur des surfaces pauvres en groupements hydroxyles, une approche alternative a été développée au laboratoire dans le cadre de précédents travaux [224,270]. Cette dernière est basée sur une fluidification du PDMS avec de l'heptane avant étalement sur un support par centrifugation (spin-coating). La fine couche polymérisée adhère sur le support grâce à la formation d'un grand nombre de liaisons faibles entre le support et le PDMS. Il est ainsi

possible de l'employer pour le collage d'un microcanal en PDMS, en principe irréversible entre la couche mince de PDMS et le microcanal, mais réversible entre la fine couche et le support. La chambre microfluidique peut ainsi aisément être descellée, ce qui permet par exemple la récupération du support après emploi. Cette approche peut s'avérer très utile lorsque le support est onéreux (ex : substrat piézoélectrique) ou lorsqu'il intègre des électrodes ou des structures magnétiques tels que les micro-aimants TMP fournis par l'Institut Néel, obtenues à l'issue d'un procédé de fabrication relativement long (cf. Chapitre 2).

Ce principe de collage réversible ayant été explicité, nous pouvons à présent détailler le procédé de fabrication mis au point pour intégrer des structures magnétiques en PDMS composite dans un bloc de PDMS servant de socle pour le trieur magnétique développé (cf. figure 73).

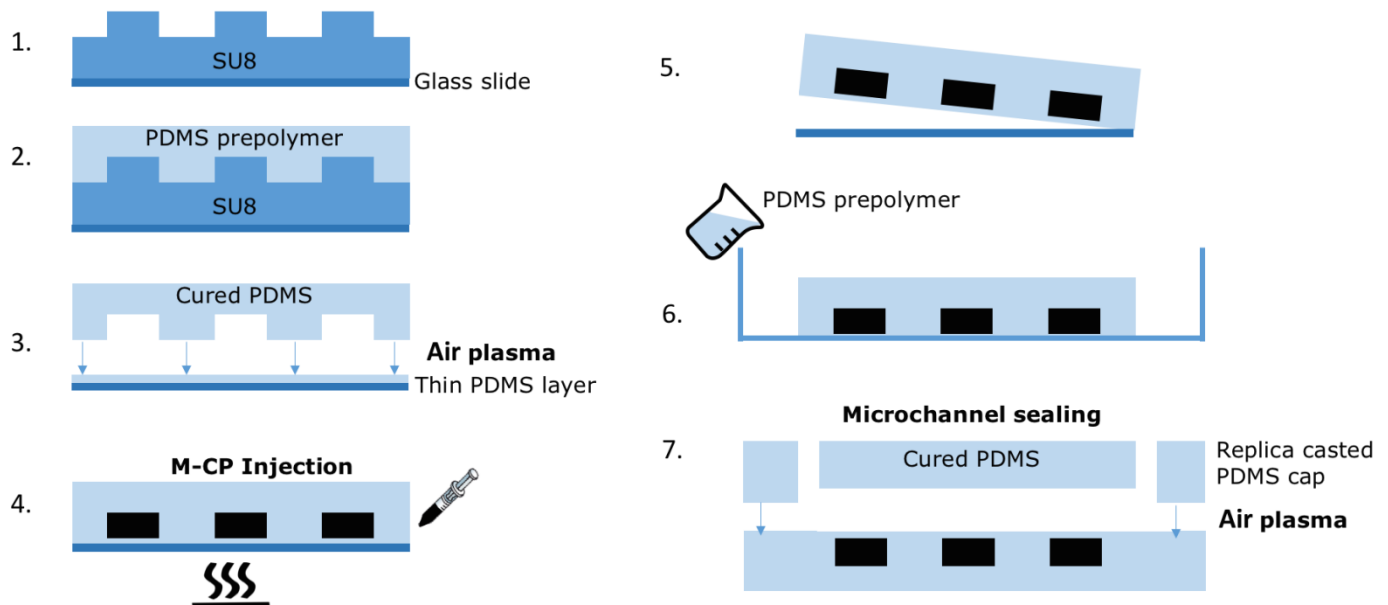


Figure 73 : Procédé de fabrication mis au point pour l'obtention d'un trieur magnétique de cellules tel que présenté Figure 63.

Les différentes étapes du protocole décrit à la figure 74 sont les suivantes :

1. Réalisation d'un moule en résine négative SU-8 d'épaisseur 50 μm .
2. Formation d'un réseau de microcanaux en PDMS à partir de ce moule (réplication par moulage).
3. Collage réversible de ce moule en PDMS par oxydation plasma sur une lame de verre recouverte d'une fine couche de PDMS étalée à la tournette.
4. Injection de PDMS magnétique (M-PDMS) dans les microcanaux et recuit sur plaque chauffante (120 °C-2 minutes).
5. Découpage du bloc de PDMS intégrant les bandes magnétiques obtenues à l'issue de l'étape d'injection.
6. Découpage d'un sous-bloc (cf. pointillés figure 75B) et ajout de PDMS autour de ce sous-bloc pour obtenir un large socle en PDMS intégrant les motifs magnétiques.
7. Collage irréversible (par traitement plasma) d'un canal microfluidique en PDMS sur le socle intégrant les bandes magnétiques.

Ces étapes sont détaillées ci-après :

- **Fabrication d'un moule en PDMS pour l'injection de PDMS composite (étapes 1 à 3) :**

En première étape, un réseau de canaux parallèles dédiés à l'injection de M-PDMS (largeur comprise entre 50 et 200 μm) et pourvu d'une entrée et d'une sortie est fabriqué par lithographie douce à partir d'un moule en SU-8.

Pour cela, une couche de résine photosensible négative d'épaisseur 50 μm (SU-8 2035, MicroChem) est étalée sur une lame de verre (75 mm×25 mm) à la tournette (Spin 150 SPS, 500 rpm pendant 10 s, puis 2000 rpm pendant 1 min). Il s'ensuit une étape de recuit sur plaque chauffante (2 min 30 s à 65 °C, puis 8 min à 95 °C). Cette étape assure notamment l'élimination d'une partie des solvants de la résine ainsi que la polymérisation de la matrice. La résine est ensuite exposée aux UV (système d'exposition KLOE UV-KUB, irradiance 25mW/cm², durée 12s) à travers un masque dessiné avec le logiciel CleWin puis imprimé sur film plastique (Cirly). Un second recuit sur plaque chauffante est effectué (65 °C pendant 1 min 30 s puis 6 min 30 s à 95 °C). Enfin, la résine est développée par immersion dans une solution de Propylène Glycol Monométhyl Ether Acétate (PGMEA, Sigma-Aldrich). Cette étape réalisée sous agitation dure environ 4 min. La lame portant le masque de résine est ensuite rincée avec de l'isopropanol puis séchée sous flux d'azote (cf. figure 74 étape 1).

Le PDMS est ensuite préparé par mélange du prépolymère (Sylgard 184 Silicone Elastomer, Neyco) avec l'agent réticulant (Sylgard 184 curing agent) dans un rapport massique de 10 :1. Une étape de dégazage sous vide permet alors d'éliminer les bulles d'air formées durant le mélange. Ce dernier est ensuite versé sur le moule en SU- 8 puis l'ensemble est placé dans une étuve à 80 °C durant 2 h (cf. figure 73, étape 2). Une fois polymérisé, le PDMS est démoulé et des ouvertures sont formées à chaque extrémité du réseau de microcanaux à l'aide d'un poinçon de 1 mm.

Une fine couche de PDMS (~1 à 2 μm [271]) est ensuite formée sur une lame de verre en déposant à la tournette un mélange PDMS/heptane à un ratio de 10 % w/w (4500 rpm, 1 min). La lame est ensuite placée 2h à l'étuve à 80 °C. Il reste alors à effectuer un collage plasma

(Expanded Plasma Cleaner, Harrick Plasma) entre le réseau de canaux servant de moule pour l'injection et la lame de verre recouverte d'une fine couche de PDMS, comme décrit en étape 3 à la figure 73. Le PDMS magnétique peut alors être injecté dans la structure obtenue.

- **Préparation et injection du PDMS magnétique (étape 4) :**

L'étape d'injection de PDMS magnétique a été réalisée avec des poudres magnétiques de fer-carbonyl (FC) ou de néodyme-fer-bore (NdFeB). Le PDMS est préparé en mélangeant la base avec l'agent réticulant dans un rapport massique 10 :1 puis mélangé vigoureusement à la poudre de matériau magnétique doux ou dur à l'aide d'une spatule. Après homogénéisation, le mélange est introduit dans une seringue de 1 ml comportant une aiguille plate à son extrémité afin de faciliter l'injection. Si la méthode employée pour fabriquer et injecter du PDMS magnétique contenant chacune de ces poudres est la même, l'injection est toutefois plus facile à réaliser pour le FC que pour le NdFeB. En effet, il est possible d'inclure jusqu'à 75 % en masse de poudre magnétique de FC, alors que le maximum est de 66 % pour les poudres de NdFeB. Cet écart se justifie par les caractéristiques différentes des deux types de particules (taille, forme, hétérogénéité...). Au-delà, il y a une forte probabilité de détériorer le dispositif lors de l'étape d'injection avec généralement un décollement local entre le bloc de PDMS de la lame de verre. De même pour ces taux, l'injection devient très délicate pour des bandes magnétiques de largeur inférieure à 50 μm , et ce pour les 2 types de poudres considérés. A l'issue de l'étape d'injection, la lame de verre servant de support au dispositif est déposée sur une plaque chauffante à 120 °C durant 2 minutes afin d'accélérer la polymérisation du PDMS composite, puis elle est placée à l'étuve à 80 °C durant 2h. Si l'étape de recuit sur plaque chauffante est omise, on observe la formation d'amas de particules au sein des bandes, ce qui en diminue la qualité (cf. figure 74). Cette observation rejoint les conclusions de Zhou et collaborateurs [269], qui ont employé des températures de recuit supérieures (150 °C) et sur des durées plus longues (10 minutes), ce qui peut s'expliquer par la taille plus importante de leurs zone d'injection de PDMS magnétique (zone d'injection de 500 μm de large avec des renforcements en direction du canal microfluidique de 1000 μm). On notera que la fiche technique de la poudre MQFP (Magnequench) recommande de ne pas dépasser une température de 120-150°C dans les différents procédés où elle est employée.

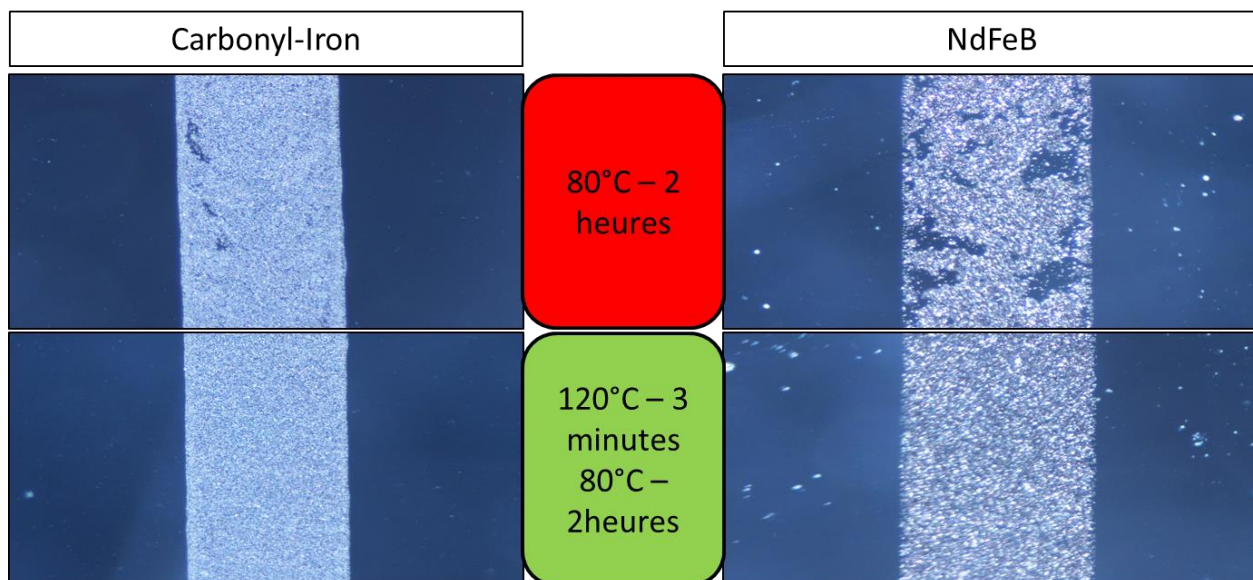


Figure 74: Observation en champ sombre d'une bande de PDMS magnétique obtenue par injection dans un canal microfluidique de 400 μm de large et 50 μm d'épaisseur (pourcentage massique de particules de 66 % pour les deux types de poudres). En haut : Polymérisation en étuve à 80 °C durant 2 h. En bas : Polymérisation accélérée sur plaque chauffante (2 min à 120 °C, puis 2h en étuve à 80 °C).

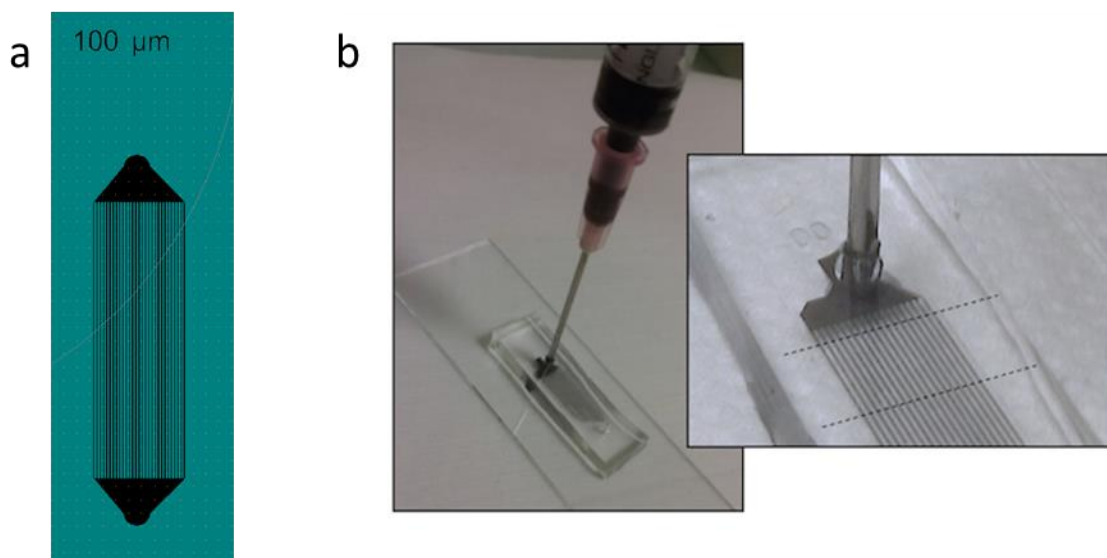


Figure 75: A. Dessin (CleWin) du masque définissant la géométrie des moules employés pour l'injection (bandes parallèles de taille 50 ou 100 μm) utilisé à l'étape 1. B. Illustration de l'étape 4: injection de PDMS composite dans un réseau de microcanaux en PDMS collé de façon réversible sur une lame de verre. Les pointillés délimitent le bloc découpé ultérieurement (entre les étapes 5 et 6).

- **Assemblage final du microsystème (étapes 5 à 7)**

Après polymérisation et refroidissement, le bloc de PDMS comportant les canaux remplis est détaché de la lame de verre, grâce au collage réversible entre la lame de verre et la fine couche de PDMS (étape 5). Les microstructures obtenues sont présentées à la figure 76.

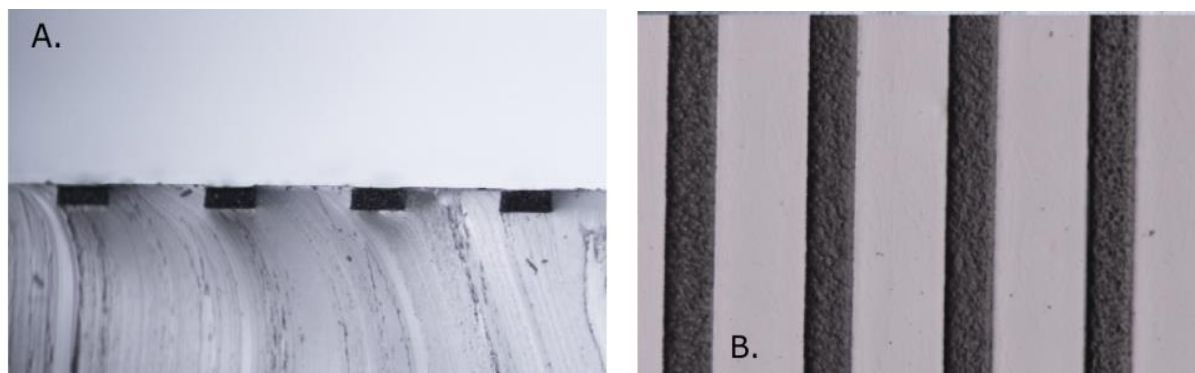


Figure 76: Observation des bandes en PDMS magnétique par microscopie optique. (a) Vue en coupe du PDMS permettant de vérifier que les bandes sont affleurantes à la surface. (b) Vue de dessus des bandes de 100 μm espacées de 200 μm .

Il est ensuite découpé afin d'obtenir plusieurs petits pavés en PDMS intégrant des bandes magnétiques. A ce stade, les microstructures en composite NdFeB-PDMS sont aimantées de façon permanente à l'aide d'un système de champs magnétiques pulsés développé à l'Institut Néel en collaboration avec le l'Université fédérale du Paraná [272]. Ce système produit un champ de 6 T, uniforme sur une largeur de quelques mm. Un film magnéto-optique (MOIF pour Magneto Optical Indicator Film) placé sur l'échantillon permet de s'assurer de l'aimantation effective des bandes magnétiques (cf. figure 77). Le principe de fonctionnement de ce film repose sur les modifications de l'état de polarisation de la lumière à la sortie de l'indicateur constitué de grenats et d'un miroir réfléchissant la lumière. Ces modifications sont induites par les champs de fuites de l'échantillon (effet Faraday).

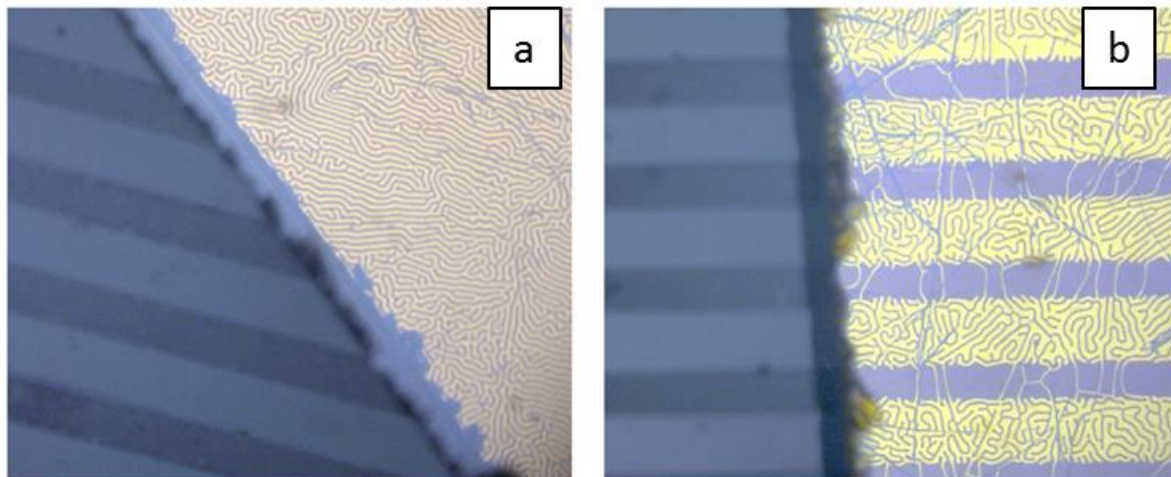


Figure 77 : Vérification de l'aimantation des structures magnétiques en NdFeB. Images magnéto-optiques obtenues avant (a) et après aimantation (b).

Suite à cette étape (non effectuée pour les dispositifs en composite PDMS-FC), l'échantillon est pressé sur le fond d'une boîte de Pétri (bandes magnétiques en bas) et recouvert de mélange PDMS/réticulant au ratio 10 :1 (ayant été dégazé). Ceci a pour but d'intégrer les structures magnétiques dans un socle en PDMS plus large, sur lequel il sera plus facile de coller la chambre fluide (étape 6).

Enfin, un microcanal doté de deux entrées et deux sorties (double Y), de largeur 400 μm et de hauteur 50 μm est scellé de manière irréversible sur ce socle en PDMS par collage plasma, afin de former la puce microfluidique (étape 7). Ce microcanal a été fabriqué en suivant les étapes 1 et 2 décrites précédemment.

La figure 78 montre le résultat de l'assemblage et illustre le caractère laminaire des écoulements engendrés dans un tel dispositif. Les écoulements sont générés à l'aide d'un pousse-seringue NE-4000 (Multi-Phaser Double Syringe pump) permettant de contrôler le débit. La connexion avec le dispositif est réalisée par l'intermédiaire d'un tube PTFE (1/32" ID $\times$ 1/16" OD) inséré directement dans les ouvertures formées au niveau des entrées du canal en PDMS (de diamètre 1.25 mm). Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope droit (Nikon LV150).

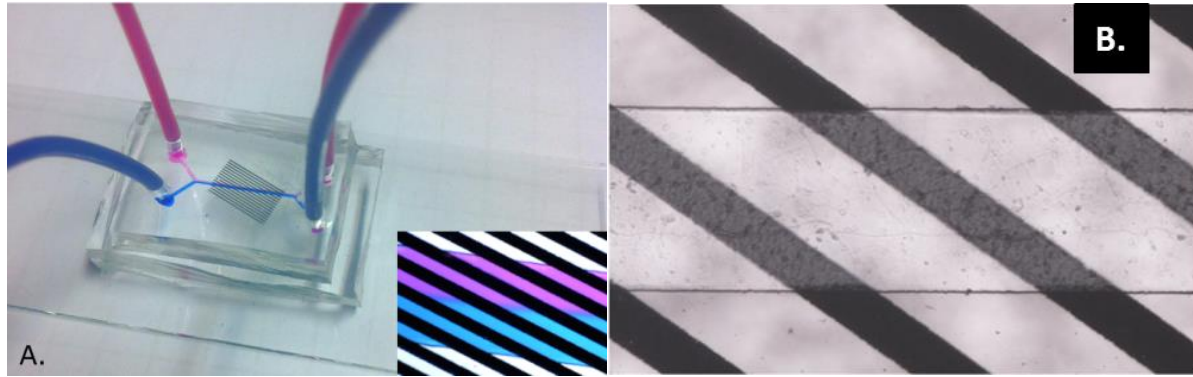


Figure 78 : Observation du microsysteme obtenu après assemblage final A : Vue d'ensemble du microsysteme où sont injectés à même débit deux encres de couleurs différentes pour l'observation des écoulements laminaires. B : Zoom x 50 sur le microcanal.

Afin d'évaluer les performances du dispositif ainsi réalisé, des simulations du champ magnétique généré ont été effectuées, ce qui a nécessité en premier lieu la caractérisation du PDMS magnétique (afin de connaître la valeur de la perméabilité apparente du matériau μ_r dans le cas des matériaux doux ou l'aimantation rémanente B_r dans le cas des matériaux durs).

IV. Caractérisation du PDMS magnétique

Afin d'évaluer les propriétés magnétiques des structures en PDMS composite, des cubes de 4 mm de côté en PDMS dopé à partir de poudres de FC (75 %) et de NdFeB (66 %) ont été préparés.

Le moment magnétique des échantillons ($A.m^2$) a pu être mesuré en fonction du champ appliqué (en T), à l'aide d'un magnétomètre à extraction disponible à l'Institut Néel (Grenoble). Les échantillons ont également été pesés. Ceci a permis d'obtenir la figure suivante :

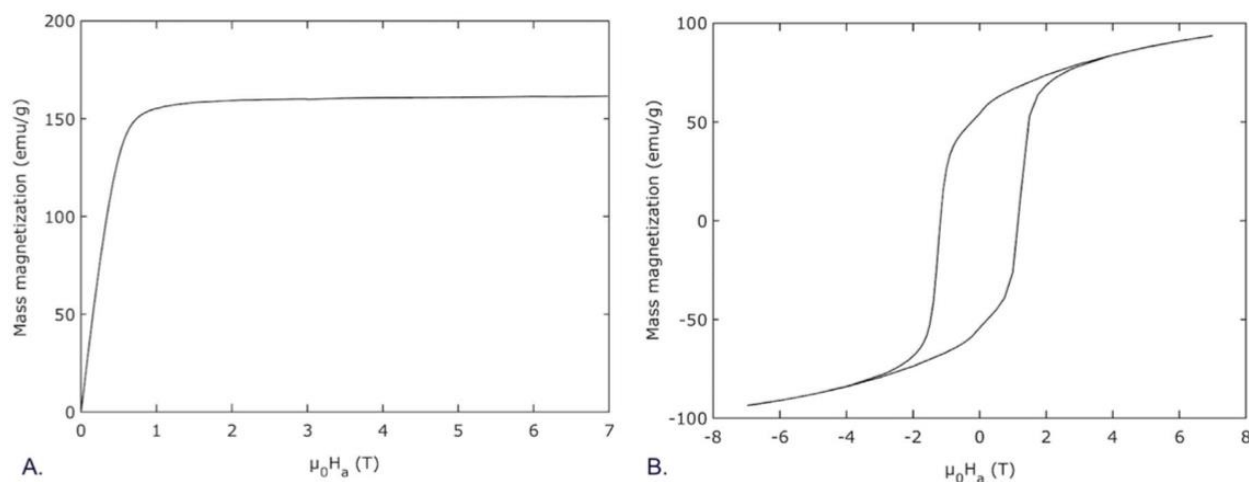


Figure 79 : A. Courbe d'aimantation obtenue pour un échantillon de FC-PDMS (75 % de particules en pourcentage massique) B. Courbe d'aimantation d'un échantillon de NdFeB-PDMS (66 % de poudre de NdFeB).

D'après Li et collaborateurs [273], l'aimantation (massique) à saturation des particules de FC (sans PDMS) est égale à 200 emu/g. Dans le cas du FC-PDMS (75 % FC), la valeur que nous obtenons est de 161 emu/g, ce qui est conforme aux résultats également obtenus par Li. En considérant de plus la densité des différents échantillons, nous avons pu déduire leur volume et tracer l'aimantation de l'échantillon en A/m, toujours en fonction du champ appliqué. Cette courbe nous permet d'obtenir la susceptibilité magnétique apparente des échantillons, qui correspond à sa pente dans la partie linéaire. La valeur de susceptibilité mesurée est de 1.23, ce qui donne une perméabilité relative égale à 2.23.

En ce qui concerne le NdFeB-PDMS, l'aimantation rémanente mesurée est d'environ 54 emu/g. L'induction rémanente déduite des mesures de volume de l'échantillon a pu ainsi être estimée à ~ 0.2 T. A titre de comparaison, pour la poudre de NdFeB non mélangée au PDMS, la fiche technique indique une induction rémanente B_r de 0.8 T.

V. Simulations numériques du champ magnétique généré

Des simulations multiphysiques visant à évaluer les performances du dispositif ont été réalisées par Yoann Hériveaux lors de son stage de M2 au laboratoire Ampère. Deux approches ont été explorées : la première était basée sur l'utilisation du logiciel de calcul par éléments finis Comsol, puis, du fait de certaines difficultés liées à la discrétisation du domaine géométrique, et dans le but d'optimiser les temps de calcul, un autre modèle a été développé sous Matlab. Ces simulations visaient d'une part l'étude de la cartographie de champ magnétique dans le microsystème et d'autre part le tracé des trajectoires des particules sous flux. Seuls les résultats liés au calcul du champ magnétique sous Matlab sont présentés ci-après, le tracé des trajectoires nécessitant encore quelques analyses et améliorations en cours. L'approche adoptée se base sur la méthode des moments et s'inspire de celle décrite par Chadebec et collaborateurs, qui dans leur cas cherchent à calculer le champ magnétique dans des barres magnétiques cylindriques afin d'étudier des trajectoires de satellites [274].

La figure 80 représente l'induction B et le gradient d'induction dB/dz calculé $2\text{ }\mu\text{m}$ au-dessus des bandes magnétiques réalisées en matériau magnétique doux ou dur, à partir des caractérisations présentées au paragraphe précédent. Ces simulations ont été effectuées pour 8 bandes de largeur $100\text{ }\mu\text{m}$. Dans le cas du dispositif en FC-PDMS, la source de champ externe est constituée d'un aimant permanent en NdFeB ($B_r \approx 1.3\text{ T}$) de taille $3 \times 1 \times 0.5\text{ cm}$ (aimantation vers le haut) placé sous le canal (perpendiculairement à sa direction), à une distance de 2 mm des bandes.

Comme prévu, le champ magnétique est plus fort dans le cas des barrettes en matériau doux du fait de la présence de l'aimant permanent, ce qui peut représenter un avantage dans la mesure où cela renforcera l'aimantation des objets cibles. Pour les deux types de matériaux, des valeurs de gradient de champ importantes ont été obtenues, pouvant atteindre $1.3 \times 10^4\text{ T/m}$ dans le cas du NdFeB-PDMS. On peut supposer que ces valeurs sont probablement sous-estimées, dans la mesure où elles ne tiennent pas compte des inhomogénéités locales liées à la composition du PDMS magnétique.

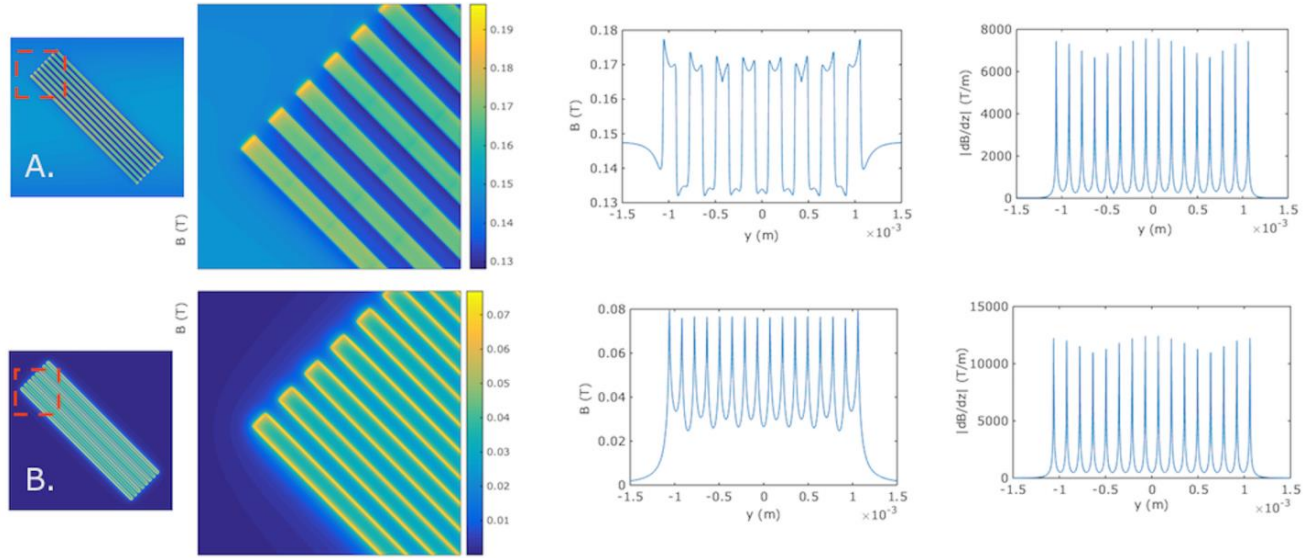


Figure 80 : Simulations sous Matlab de l'induction magnétique B et du gradient d'induction magnétique $|dB/dz|$ calculé pour une coupe 2D réalisée $2\ \mu\text{m}$ au-dessus de bandes en aimants doux (A) ou permanents (B), ainsi que pour une coupe 1D effectuée au milieu des bandes. Dans le cas du FC-PDMS, on observe un décalage dû au champ magnétique rayonné par la source de champ externe ($\approx 145\ \text{mT}$).

VI. Test en présence de particules

A. Tests d'attraction en « statique »

Le potentiel d'attraction d'entités magnétiques sur les bandes a été contrôlé pour les deux types de PDMS composites (FC et NdFeB) par une série d'expériences impliquant différents types de particules (particules magnétiques de diamètre 10 et $1\ \mu\text{m}$ et bactéries magnétiques marquées avec des nanoparticules superparamagnétiques de 50 nm). Le tableau 7 donne les références des différentes particules employées. La solution de particules est déposée directement à la surface d'un bloc de PDMS intégrant les structures magnétiques. Dans le cas des particules de $10\ \mu\text{m}$, non fluorescentes, les observations sont réalisées sous un microscope droit (Nikon LV150) en champ sombre, afin de renforcer le contraste entre les particules et les bandes magnétiques. Le filtre utilisé sur le microscope bloque une partie de la lumière réémise directement dans l'objectif par l'objet observé mais reste perméable aux rayonnements déviés, ce qui permet d'accroître le contraste entre particules et bandes magnétiques.

Les particules magnétiques de 1 μm (Sigma) sont quant à elles fonctionnalisées avec de la streptavidine. Nous avons exploité l'affinité de cette protéine avec la biotine pour rendre les particules fluorescentes (par incubation avec de la biotine fluorescente). Enfin, des tests d'attraction ont également été réalisés en présence de bactéries *E. coli* marquées avec des nanoparticules superparamagnétiques de 50 nm par hybridation *in situ* suivant le protocole décrit au chapitre 2. Pour ces deux dernières expériences, les observations ont été réalisées sous microscope à fluorescence (Zeiss Axio Imager équipé d'un filtre DsRed).

Nom	Réf	Fournisseur	Taille	Fonctionnalisation
Streptavidin Microbeads	130-048-101	Miltenyi	50 nm	Streptavidine
Microparticles, magnetic streptavidin coated	49532	Sigma	1 μm	Streptavidine
Microparticles based on polystyrene magnetic	49664	Fluka	10 μm	-

Tableau 7 : Description des particules magnétiques utilisées.

La figure 81 montre l'attraction des particules de 10 μm sur les bandes magnétiques en NdFeB-PDMS. Ces dernières s'accumulent sur les bandes, notamment au niveau des bords. Pour rappel, la force magnétique dirige les particules suivant la direction du gradient de champ magnétique, vers les régions de champ maximum. Ces régions correspondent aux bords des bandes, comme indiqué par les simulations.

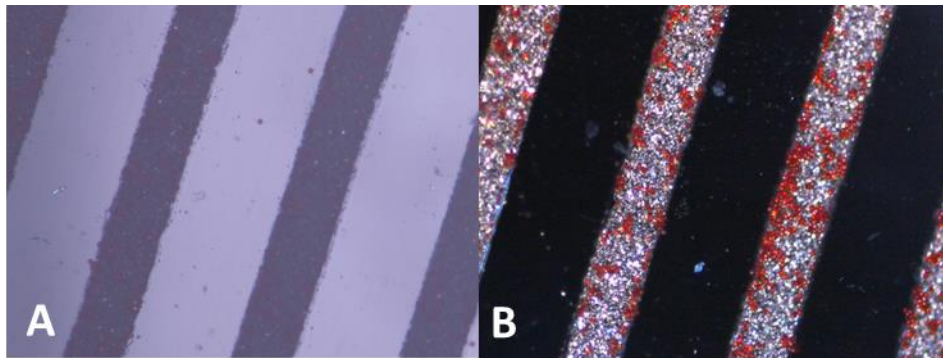


Figure 81 : Particules de 10 μm attirées sur les bandes magnétiques. Bien qu'une observation en fond clair (A) ne permette pas de voir les particules, celles-ci apparaissent de façon beaucoup plus contrastée en champ sombre (B).

La figure 82a illustre le cas de particules de 10 μm attirées sur les bandes magnétiques en FC-PDMS. Sur l'image, on constate que les particules se placent majoritairement sur l'un des bords des bandes. Cela s'explique par la position relative des bandes par rapport à celle de l'aimant permanent placée sous le dispositif (générant lui-même un champ non uniforme) comme illustré par les simulations (Comsol) 2D présentées (cf. figure 82b et c).

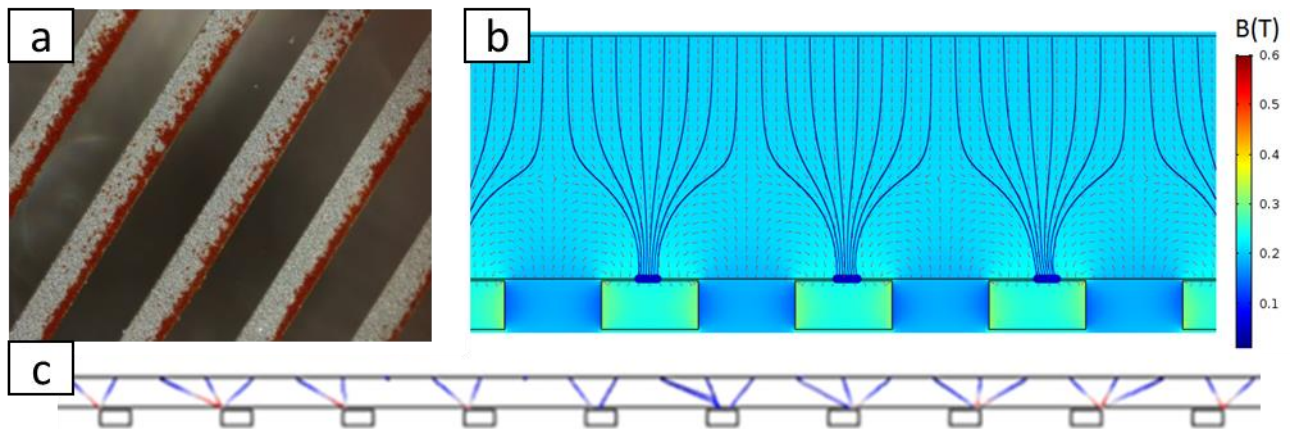


Figure 82 : a. Piégeage des particules de 10 μm sur les bords des bandes. b. Piégeage par des bandes magnétiques en matériau doux de particules lâchées en haut du canal, tel que simulé en statique sous Comsol, (tracé du champ magnétique et du champ de force appliqué sur ces particules, zoom au niveau du milieu du canal). c. Vue générale du canal, montrant que, si les particules sont bien piégées par les bandes magnétiques, elles tendent à être piégées sur l'extrémité droite des bandes en entrée du canal, et sur l'extrémité gauche des bandes en sortie du canal.

La figure 83 présente les résultats d'attraction pour les billes magnétiques de diamètre 1 μm et pour les bactéries *E.coli* marquées magnétiquement par hybridation *in situ*, et pour des bandes en matériau doux ou dur. Dans le cas des billes de 1 μm , on observe sur la figure 83 (A et B) que celles-ci se retrouvent effectivement toutes piégées au niveau des bandes magnétiques. La majorité des bactéries sont également piégées, mais une faible proportion reste cependant entre les bandes magnétiques, probablement due à une absence de marquage sur certaines des bactéries déposées.

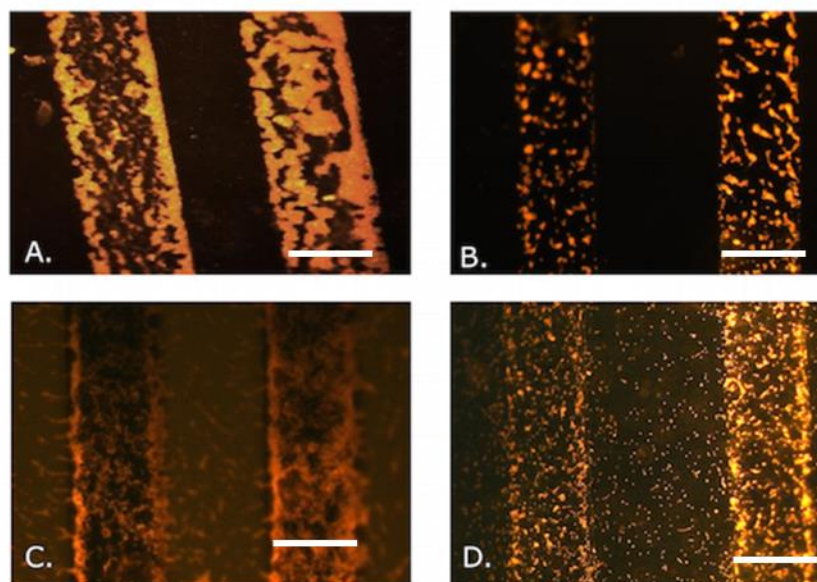


Figure 83 : Test d'attraction de différents types de particules sur les bandes en PDMS composite : particules magnétiques de 1 μm piégées sur des bandes en FC-PDMS (A) ou en NdFeB-PDMS (B). Bactéries marquées avec des nanoparticules superparamagnétiques de 50 nm attirées par les structures en FC-PDMS (C) ou en NdFeB-PDMS (D). Barre d'échelle = 100 μm .

B. Tests de déflexion magnétique

Les mêmes lots de particules ont été utilisés pour vérifier la capacité des bandes à dévier les objets magnétiques lors de leur passage dans le microsystème. Les solutions de particules ont été injectées dans le dispositif à l'aide d'un pousse seringue à deux voies (cf. figure 84) permettant d'obtenir un débit constant et identique au niveau des deux entrées et, compte-tenu de la symétrie du microcanal en double Y, une séparation entre les deux flux laminaires au milieu du canal (cf. figure 78a).

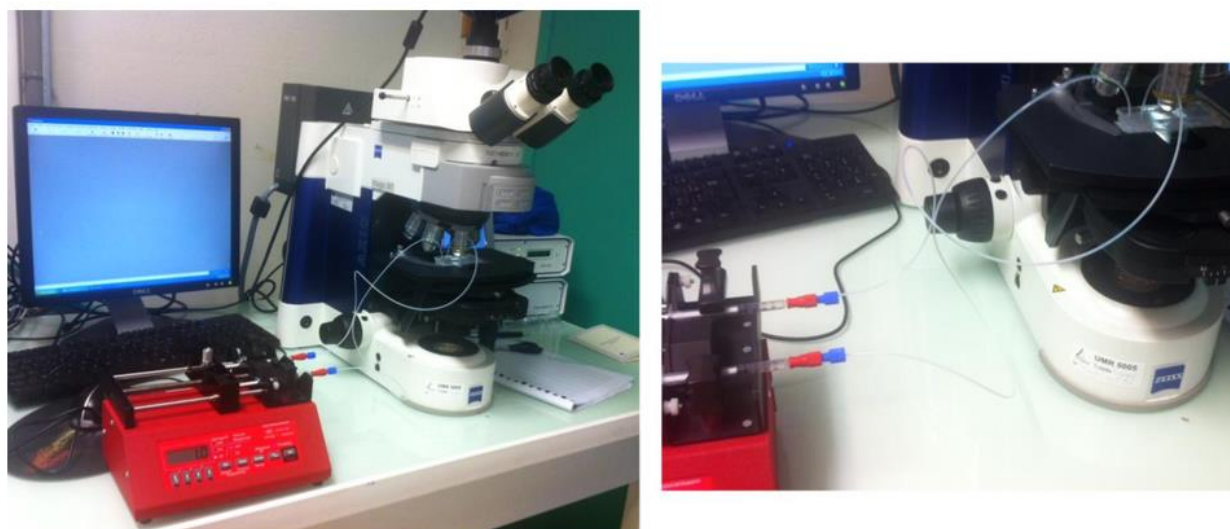


Figure 84 : Présentation du système expérimental (pousse seringue à deux voies Ne-4000 New Era Pump Systems Inc pour l'injection des solutions et microscope Zeiss Axio Imager pour l'observation des particules fluorescentes circulant dans la chambre microfluidique.

La figure 85 montre les résultats des tests de déflexion magnétique. Les solutions proviennent de deux entrées situées sur la gauche des photos. L'entrée réservée à l'injection des particules se situe en haut, tandis que celle réservée à l'injection de milieu propre (eau déionisée) se trouve sur la partie inférieure de l'image, conformément au schéma de la figure 62.

La figure 85A illustre le cas de billes magnétiques de 10 μm introduites dans un dispositif intégrant en fond de canal des bandes magnétiques à base de fer-carbonyle. On remarque que les billes quittent le flux associé à l'échantillon pour rejoindre celui associé au milieu « propre ». En effet, les billes suivent progressivement les différents rails magnétiques pour se retrouver dans la partie inférieure du canal. La déviation reste observable pour des débits pouvant atteindre

50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Au-delà, les billes ne sont plus piégées ni déviées par les bandes magnétiques, la force de traînée devenant alors prédominante. En revanche, pour des débits trop faibles (de l'ordre de $1\mu\text{L}/\text{min}$), les particules sont piégées au niveau des premières bandes et ne sortent pas du dispositif.

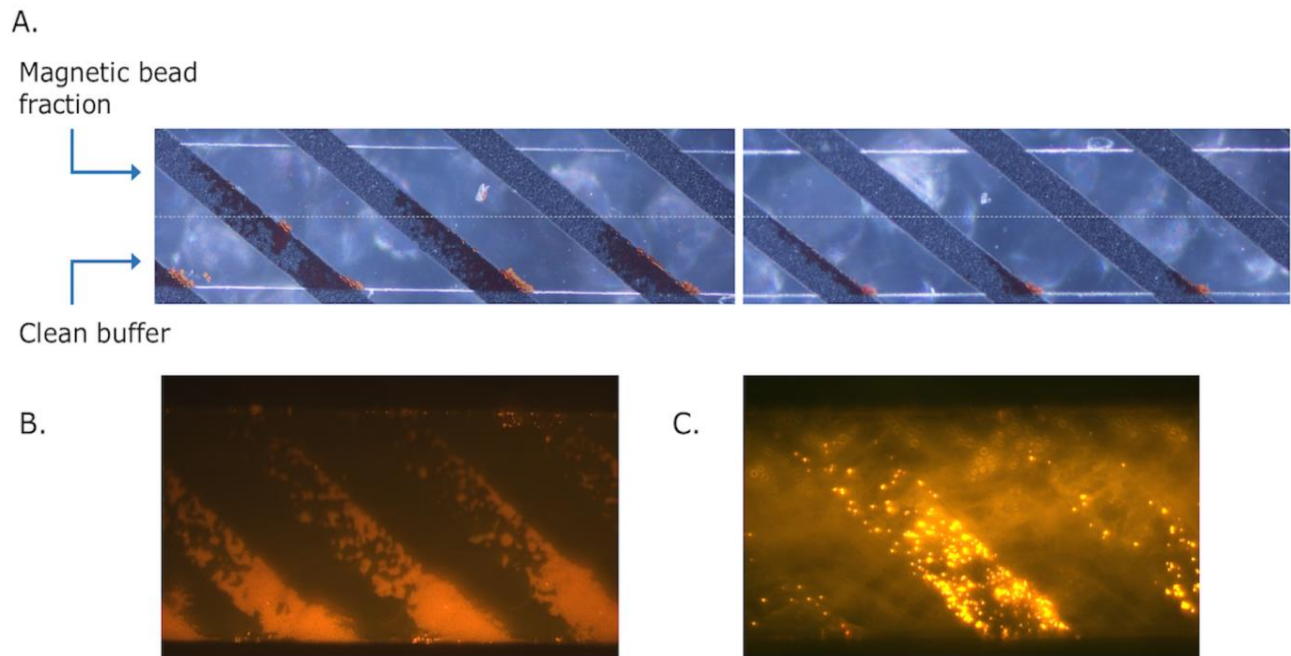


Figure 85 : Résultats des tests de déviation des particules magnétiques. A : Test en présence de particules magnétiques de 10 μm (observations réalisées en champ sombre sous microscope Nikon LV150), réalisé avec un dispositif en FC-PDMS placé 2 mm au-dessus d'un aimant permanent. B : Expérience réalisée avec des particules magnétiques de 1 μm fluorescentes et un dispositif en NdFeB-PDMS (observation réalisée en fluorescence sous microscope Zeiss Axio Imager). C : Test en présence de bactéries marquées par hybridation in situ magnétique ainsi qu'avec du BET (dispositif en NdFeB-PDMS).

La déviation de bactéries marquées magnétiquement est cependant moins évidente. En effet, même pour des flux très élevés ($>500\ \mu\text{L}/\text{min}$), les bactéries tendent à rester piégées sur les bandes magnétiques. Ceci est probablement lié à des problèmes d'adsorption des protéines à la surface des bandes. Un prétraitement du microsystème avec de la BSA (Bovin Serum Albumin) pourrait notamment permettre de remédier à ce problème. La figure 85 illustre la déviation de billes superparamagnétiques (B) et de bactéries marquées (C) pour des dispositifs en NdFeB-PDMS. On voit là encore que les entités magnétiques sont davantage rassemblées au niveau de la

partie inférieure des bandes alors qu'elles avaient été introduites en partie supérieure du canal. La déviation observée est cependant plus importante dans le cas des billes magnétiques, toutes regroupées au niveau de la partie inférieure de l'image.

C. Développements et optimisations en cours

Cette dernière série d'observations a permis de montrer la possibilité de réaliser le contrôle de la déviation d'entités magnétiques et ainsi le caractère fonctionnel du dispositif. Néanmoins, plusieurs points doivent encore être étudiés pour aboutir à une structure optimisée. Parmi ceux-ci, l'importance de différents paramètres tels que l'angle d'inclinaison des bandes par rapport au canal et l'épaisseur de ces dernières doivent encore être explorés, notamment par le biais de simulations.

Par ailleurs, afin d'éviter les risques d'absorption des particules aux parois, en plus de la fonctionnalisation de la surface du PDMS avec de la BSA, nous pouvons envisager l'emploi d'une structure en chevrons, permettant la déviation des entités magnétiques des bords du canal vers le milieu de celui-ci (cf. figure 86a). Un exemple de structure réalisée en FC-PDMS est présenté figure 86b.

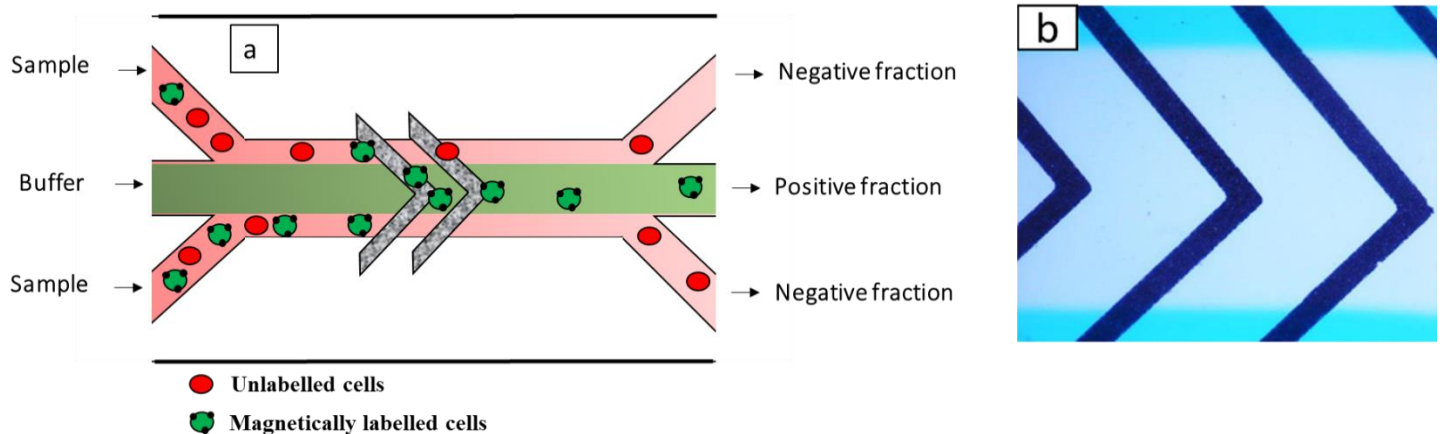


Figure 86 : a. Schéma de principe d'un dispositif intégrant des structures magnétiques en chevrons b. Photographie d'un dispositif réalisé en FC-PDMS.

Les structures magnétiques en forme de chevrons permettent de dévier les cellules marquées magnétiquement des parois du canal vers le centre.

Le procédé de fabrication présenté dans ce chapitre peut également être employé pour réaliser des « grilles magnétiques » permettant de piéger les bactéries marquées. Ceci implique la réalisation d'un réseau bidimensionnel de microcanaux pour l'injection du PDMS composite (cf. figure 87A et B). Les simulations de champ (cf. figure 87C) et l'image magnéto-optique (cf. figure 87D) obtenue après aimantation de grilles en NdFeB-PDMS montrent que le champ est maximum au-dessus des zones en PDMS non dopé, comme cela s'observe dans le cas d'une surface magnétique comportant des trous [275]. Des bactéries marquées magnétiquement et des billes superparamagnétiques de 1 μm placées sur ce type de grilles se retrouvent donc piégées sur les contours des plots en PDMS non dopé. (cf. figure 87E et F).

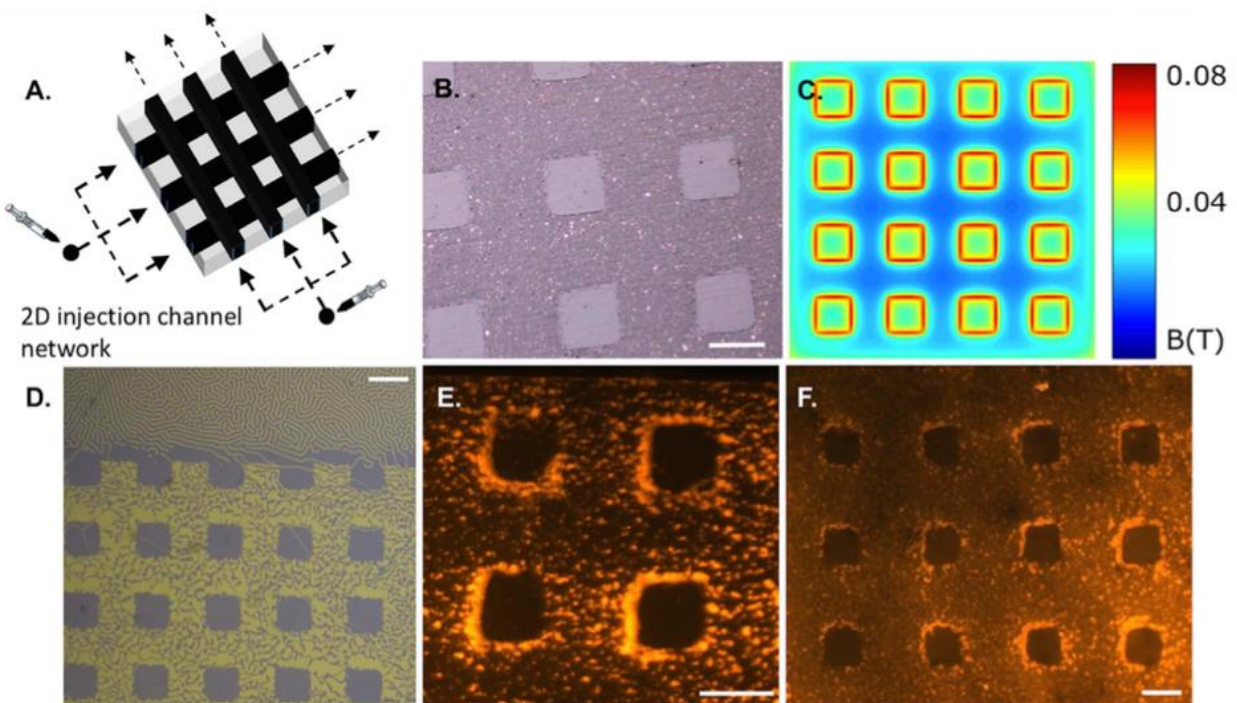


Figure 87 : Autre exemple de structure à base de PDMS composite : grille magnétique. A : Principe de l'injection du PDMS magnétique en 2D. B. Observation au microscope optique de la grille magnétique obtenue (surface plane constituée de plots en PDMS non dopé entourés de NdFeB-PDMS). C. Simulation du champ magnétique 2 μm au-dessus de la surface. D. Image magnéto-optique obtenue après aimantation. E. Bactéries marquées magnétiquement et F. billes superparamagnétiques de 1 μm piégées sur les bords des zones en PDMS non dopé. Barres d'échelle : 100 μm .

Enfin, le procédé de fabrication peut-être amélioré de plusieurs manières :

- En modifiant le choix des matériaux mélangés au PDMS (ex: particules anisotropes).
- En soumettant le PDMS dopé à un champ magnétique après structuration afin de favoriser les interactions dipole-dipole entre les particules et réduire ainsi les entrefers, qui tendent à diminuer la perméabilité magnétique apparente du matériau.
- En augmentant le pourcentage massique de particules dans le PDMS composite. Ceci pose le problème de l'injection, qui peut être résolu en employant le procédé décrit figure 88.

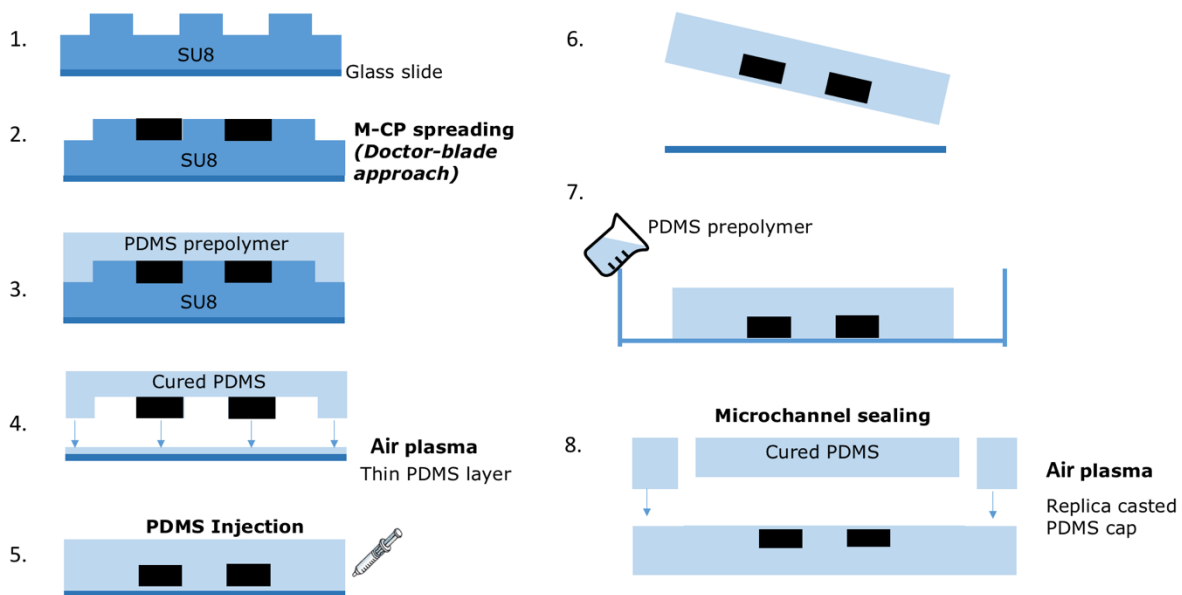


Figure 88 : Nouveau procédé de fabrication mis au point. Les changements principaux se situent au niveau de l'étape 2 où les motifs de la résine sont remplis de PDMS dopé par la technique « doctor-blade » et à l'étape 5 où du prépolymère de PDMS (non dopé) est injecté dans le dispositif.

Ce procédé reprend l'essentiel des étapes décrites dans la figure 74. Cependant, au lieu d'injecter le PDMS composite dans des canaux en PDMS non dopé, nous proposons d'injecter le PDMS non dopé, beaucoup plus fluide, entre les structures réalisées en PDMS composite. Afin de réaliser ces dernières, nous nous basons sur la technique « doctor blade » présentée au paragraphe

III-c. Le problème de la planarisation des structures en M-PDMS ainsi obtenues est à nouveau résolu ici en combinant les approches d'injection et d'utilisation d'une fine couche de PDMS pour le collage réversible du moule permettant l'injection.

Les premiers tests de fabrication ont été réalisés avec succès, en employant cette fois-ci du PDMS dopé avec de la poudre de SmFeN (Nichia) (cf. figure 90A), dont la structure cristallographique est anisotrope. Ces propriétés doivent permettre d'obtenir une aimantation rémanente (M_r) très proche de l'aimantation à saturation (M_s) et améliorer ainsi les performances par rapport aux particules de NdFeB, pour lesquelles $M_r \approx M_s/2$ (à cet effet les particules sont alignées sous champ après l'étape 2). Des exemples de réalisation de bandes parallèles (cf. figure 89) ou de plots cylindriques (cf. figure 90) en SmFeN-PDMS affleurant avec la surface sont présentés dans les figures suivantes.

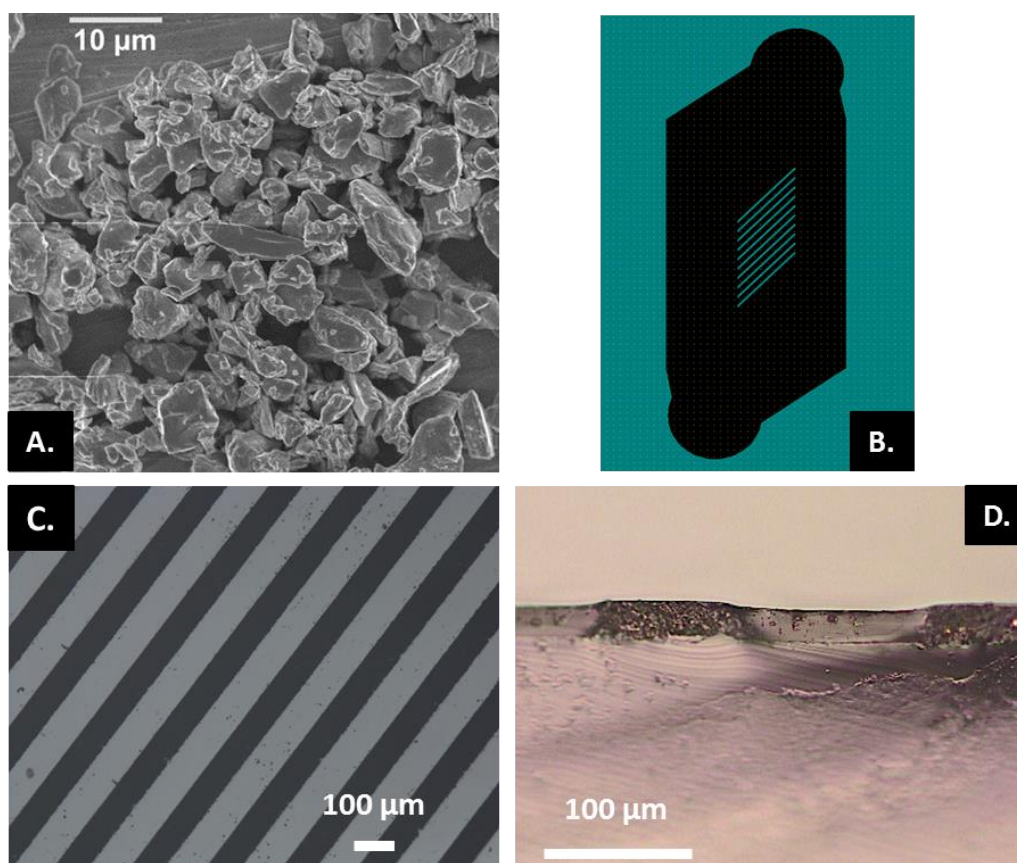


Figure 89 : Observations d'un microsystème réalisé à l'aide du protocole de fabrication couplant les techniques de « doctor blade » et d'injection de PDMS.

(A) Observation en MEB des particules de SmFeN utilisées pour la fabrication du microsystème. (B) Exemple de masque utilisé pour la fabrication du dispositif, la partie noire correspond à la zone

d'injection du PDMS (non dopé). (C) Observation en microscopie optique des bandes magnétiques obtenues. (D) Vue en coup du dispositif où l'on peut observer les structures magnétiques affleurant à la surface.

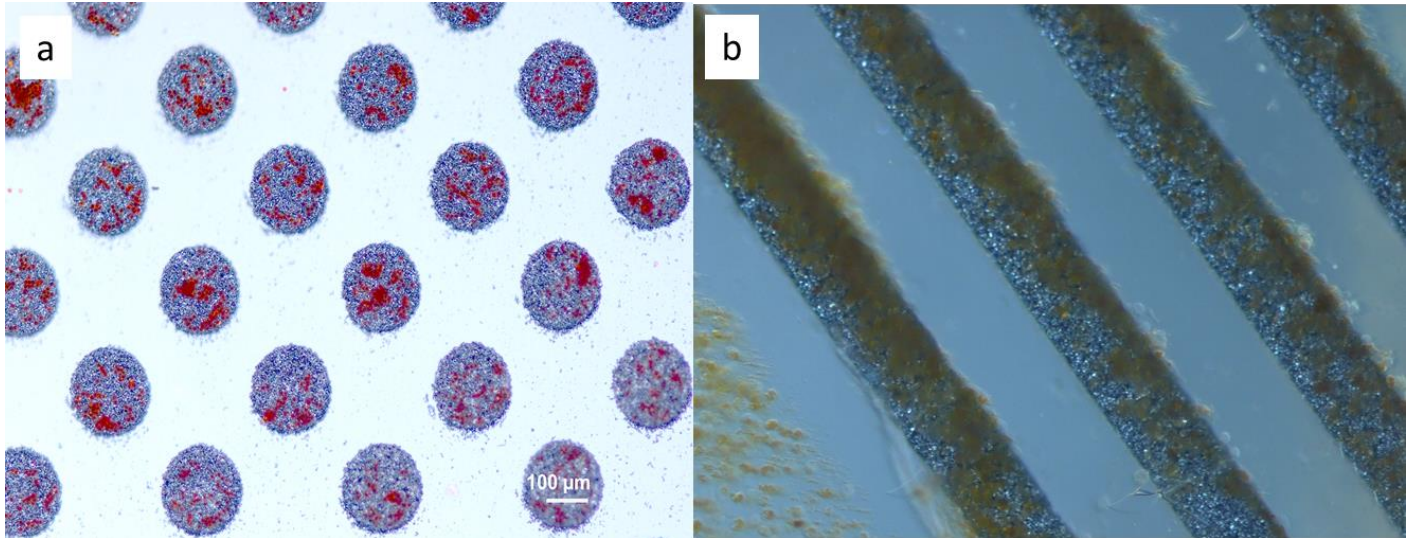


Figure 90 : Image optique d'un réseau de micro-aimants plat obtenu à partir du nouveau procédé.

Les structures en SmFeN-PDMS ont une épaisseur de 50 μm. (a) En rouge sont observées des particules magnétiques de 10 μm capturées sur les plots magnétiques. (b) En marron sont observées des cellules HEK293 (eucaryotes) incubées pendant 24h avec 50 μl de ferrofluide (concentration en fer 1 mol/L, diamètre = 7 nm).

VII. Conclusions

Le microsystème présenté dans ce chapitre a été développé avec la volonté d'une part de permettre le tri des bactéries sous flux continu et d'autre part de proposer un procédé de fabrication simple, accessible aux non-spécialistes et ne nécessitant que peu d'équipements. L'approche proposée permet de réaliser de façon générique des dispositifs autonomes et compacts à base de matériaux durs, ou contrôlables à l'aide d'une source externe lorsque des matériaux doux sont employés.

Bien que nous ayons pu valider le fonctionnement du microsystème, ce dernier n'a pas encore pu être appliqué au tri de bactéries, compte-tenu du temps nécessaire à la mise au point du procédé de fabrication. Le protocole mis au point permet de réaliser un grand nombre de dispositifs à la

suite et ce de façon très reproductible, ce qui devrait permettre leur utilisation prochaine pour le tri de bactéries marquées par hybridation *in situ*.

D'autres applications sont envisageables pour ces microsystèmes telles que le tri ou le positionnement de cellules ciblées par immunomarquage ou encore la manipulation d'objets diamagnétiques placés dans un milieu enrichi en ions paramagnétiques (afin exploiter des phénomènes de répulsion plutôt que des forces d'attraction).

Afin d'évaluer les performances du dispositif pour le tri de cellules, il sera nécessaire de compléter nos observations par la mesure de l'efficacité de séparation du microsysteme en quantifiant précisément les particules composant les fractions magnétique et non magnétique, ce qui pourrait se faire par exemple en ayant recours à la cytométrie en flux.

Conclusions Générales

Nous avons indiqué en introduction de ce manuscrit l'importance quantitative des bactéries (les organismes les plus abondants de notre planète), leur potentiel d'adaptation (ils y ont colonisé tous les écosystèmes) et leurs rôles fonctionnels fondamentaux notamment dans les grands cycles bio-géochimiques. Mis à part quelques relativement rares pathogènes, les bactéries vivent en harmonie avec l'homme qui les utilise dans de nombreux processus biotechnologiques. Pourtant leur étude demeure encore problématique comme l'ont montré nos rappels sur les biais de l'isolement en culture pure ou même sur ceux des nouvelles approches combinant métagénomique et séquençage à très haut débit. En dépit d'un potentiel déjà considérable qui aura au moins permis de révéler l'ampleur (insoupçonnée) de la tâche à réaliser, ces nouveaux outils sont encore loin de suffire pour décrypter toute la diversité du monde bactérien. Pour les milieux les plus complexes (sols), les difficultés liées au niveau phénoménal de la diversité s'additionnent de celles liées à la récupération des cellules ou de leur ADN. Les bactéries aux effectifs les plus limités (la biosphère rare), celles récalcitrantes aux traitements lytiques échappent à l'inventoriage. Alors que ces obstacles devraient unir les microbiologistes autour d'un objectif commun comme le décryptage exhaustif du microbiote d'un sol de référence par exemple [67], ceux-ci dispersent leurs ressources sur une multitude d'échantillons différents dont ils ne font qu'effleurer la complexité biologique. Métagénomique et séquençage haut débit ne sauront suffire et la reconstruction complète des différents génomes bactériens de ces microbiotes qui est pourtant l'achèvement conceptuel de la génomique des communautés (meta-génomique) est aujourd'hui hors de portée.

La démarche technologique entreprise dans cette thèse vise à développer une troisième voie d'étude de la biodiversité bactérienne environnementale. Si la diversité globale est trop importante, fractionnons son étude morceau par morceau, c'est-à-dire taxon par taxon ou fonction par fonction. Réduire la complexité de l'échantillon étudié (pour produire une sorte de sous-métagénome) devrait permettre l'étude exhaustive de ces sous-entités ce qui est impossible pour un métagénome complet. Cette démarche ne trouve son sens que si chaque sous-échantillon est parfaitement délimité et que leur somme est en mesure de reconstituer un échantillon complet. Notre objectif a été d'initier cette démarche en développant une approche de capture de cellules

bactériennes au sein d'un microbiote complexe en les sélectionnant sur des critères taxonomiques. Ce travail a nécessité de définir quel principe de marquage des bactéries devait être utilisé et d'en développer les protocoles expérimentaux en association avec un dispositif adapté de séparation entre cellules marquées et non marquées, en l'occurrence le marquage magnétique des bactéries par hybridation moléculaire et le développement d'un outil de tri microfluidique.

La première partie du travail a été consacrée au développement d'une stratégie de marquage des bactéries par hybridation *in situ*. La principale difficulté liée au développement de ce type de marquage a été de sélectionner une approche compatible avec l'utilisation de nanoparticules magnétiques dont la taille (50 nm) trop importante, rend difficile la traversée de la paroi bactérienne. Les deux méthodes retenues MISH et HCR reposent sur la formation d'une structure secondaire en arborescence (MISH) ou ordonné (HCR) lors du processus d'hybridation permettant d'adresser au niveau de la périphérie des cellules des biotines sur lesquelles vont se greffer les particules magnétiques préalablement fonctionnalisées avec de la streptavidine. Des efforts importants ont été consentis pour l'ajustement des paramètres physico-chimiques de l'hybridation, notamment la température et la concentration en formamide afin d'optimiser la spécificité de l'hybridation. Si des résultats positifs encourageants ont été obtenus dans le cadre d'expérimentations contrôlées des travaux plus proches des conditions réelles d'utilisation (un microbiote extrait du sol) ont montré la nécessité de poursuivre les mises au point, notamment en optimisant les concentrations en sondes, le temps d'hybridation et certainement d'autres paramètres. Ces travaux de développement pourront alors être réalisés d'abord sur les taxa majoritairement représentés dans le sol afin de définir en conditions réelles les limites de sensibilité. Des phyla tels que les Acidobactéries, comprenant des taxa ubiquistes de l'environnement sont par exemple des candidats particulièrement prometteurs. Ces bactéries très nombreuses, dont très peu d'espèces ont encore été cultivées *in vitro* bénéficieraient d'une application de ces approches notamment pour en appréhender au moins partiellement le rôle écologique qui reste encore très flou. Les étapes ultérieures viseront à rechercher les bactéries moins représentées et notre objectif sera d'accroître la spécificité de nos dispositifs afin de capturer les cellules de la biosphère rare. Spécificité et sensibilité seront aussi nécessaires pour cibler des bactéries sur leurs fonctions permettant même d'isoler des cellules uniques « *single*

cell » avec des applications biotechnologiques évidentes comme par exemple la capture de cellules bactériennes synthétisant des métabolites secondaires.

La technologie de tri utilisée dans le cadre du développement de l'approche de marquage impliquant un réseau de micro-aimants intégrés dans un canal microfluidique a été initiée lors de précédents travaux au laboratoire. Il nous est clairement apparu que le tri magnétique tel que pratiqué ici en 2 temps (rétention des bactéries marquées puis élution) constituait une limite à la sensibilité du fait d'une saturation des aimants. Le nouveau microsystème de tri magnétique évoluant en flux continu que nous proposons devrait en lever les limitations et sa simplicité de fabrication et d'utilisation le rendre accessible à des non spécialistes tels que des écologistes microbiens. Ce développement a nécessité la mise au point d'une méthode d'injection impliquant un protocole simple de fabrication incorporant des rails magnétiques en fond de canal. Son utilisation n'est pas limitée au tri de bactéries magnétiques et le protocole de fabrication rend possible son adaptation à différents matériaux magnétiques selon des géométries variées. Ces caractéristiques élargissent les champs d'utilisation possibles des microsystèmes notamment vers la manipulation de cellules eucaryotes,... voir leur intégration dans des microsystèmes plus complexes y compris pour former des laboratoires sur puce (*lab-on-chip*). Là encore le bon fonctionnement du dispositif a été démontré mais des optimisations techniques concernant la taille, le nombre et les inclinaisons des bandes magnétiques tout comme le dopage maximal du PDMS permettront d'en accroître les performances en termes d'efficacité du tri et de débit.

Nous avons pour objectifs d'initier/ poursuivre les développements d'une approche de marquage magnétique des bactéries afin de proposer une approche alternative aux études metagénomiques classiquement employées pour le décryptage des communautés microbiennes. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en avant les avancées réalisées. Si l'on devait en souligner les plus innovantes à nos yeux nous choisirions la HCR, une approche de marquage magnétique avec un fort potentiel en termes de spécificité et de sensibilité. Nous voulons aussi mettre en avant le protocole de fabrication de microsystèmes par injection que nous présentons dans le dernier chapitre dont la simplicité le rend accessible à des non spécialistes, condition pour que ces approches soient utilisées par les microbiologistes.

Références

1. Bryant J, Aylward F, Eppley J, Karl D, Church M, DeLong E. Wind and sunlight shape microbial diversity in surface waters of the North Pacific Subtropical Gyre. *ISME J*. Nature Publishing Group; 2015; 1–15. doi:10.1038/ismej.2015.221
2. Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58: 2717–22. doi:1444380
3. Lighthart, Bruce; Shaffer BT. Airborne Bacteria in the Atmospheric Surface Layer : Temporal Distribution above a Grass Airborne Bacteria in the Atmospheric Surface Layer : Temporal Distribution above a Grass Seed Field. 1995;61: 1492–1496.
4. Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. 1999; 659–677.
5. Bhatnagar a, Bhatnagar M. Microbial diversity in desert ecosystems. *Curr Sci*. 2005;89: 91–100. doi:10.1016/S1369-5274(02)00324-7
6. Maccario L, Vogel TM, Larose C. Potential drivers of microbial community structure and function in Arctic spring snow. *Front Microbiol*. 2014;5: 1–11. doi:10.3389/fmicb.2014.00413
7. González-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, Amils R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69: 4853–4865. doi:10.1128/AEM.69.8.4853-4865.2003
8. Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li SW, Kostandarithes HM, et al. Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site , Washington State. 2004;70: 4230–4241. doi:10.1128/AEM.70.7.4230
9. Horiike T, Hamada K, Kanaya S, Shinozawa T. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nat Cell Biol*. 2001;3: 210–214. doi:10.1038/35055129
10. Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*. 2008;320: 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
11. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
12. Danhorn T, Fuqua C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61: 401–422. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093316
13. Hooper L V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol*. 2004;12: 129–134. doi:10.1016/j.tim.2004.01.001
14. Backhed F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science (80-)*. 2005;307: 1915–1920. doi:10.1126/science.1104816
15. Kong HH, Segre J a. Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. *J Invest Dermatol*. Nature Publishing Group; 2012;132: 933–939. doi:10.1038/jid.2011.417
16. Lozupone C a., Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489: 220–230. doi:10.1038/nature11550
17. Anand a AP, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DIG, Vasan PT, Raghuraman T, et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade

- cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci.* 2010;10: 107. doi:10.1673/031.010.10701
18. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity.* 2012;37: 158–170. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011
 19. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev.* 2011;69: 392–403. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00402.x
 20. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. *NatRevMicrobiol.* 2005;3: 601–610. doi:10.1038/nrmicro1205
 21. Young KD. Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol.* 2007;10: 596–600. doi:10.1016/j.mib.2007.09.009
 22. Land M, Hauser L, Jun S-R, Nookaew I, Leuze MR, Ahn T-H, et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics.* 2015;15: 141–61. doi:10.1007/s10142-015-0433-4
 23. Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, Van Den Berg M, Müller U, Heijne W, et al. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol.* 2010;2: 212–224. doi:10.1093/gbe/evq013
 24. Heuer H, Smalla K. Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36: 1083–1104. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00337.x
 25. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 1999;50: 131–149. doi:10.1016/S0168-1605(99)00082-3
 26. Lee SY, Kim HU, Park JH, Park JM, Kim TY. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discov Today.* 2009;14: 78–88. doi:10.1016/j.drudis.2008.08.004
 27. Belmares R, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Coronel AR, Aguilar CN. Microbial production of tannase: An enzyme with potential use in food industry. *LWT - Food Sci Technol.* 2004;37: 857–864. doi:10.1016/j.lwt.2004.04.002
 28. Road TC. New erythromycins from a recombinant *S. erythraea* strain. *J Antibiot.* 1998;51.
 29. Lee CM, Chen PC, Wang CC, Tung YC. Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. *Int J Hydrogen Energy.* 2002;27: 1309–1313. doi:10.1016/S0360-3199(02)00102-7
 30. Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 2005;23: 291–298. doi:10.1016/j.tibtech.2005.04.008
 31. Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 2006;14: 512–518. doi:10.1016/j.tim.2006.10.003
 32. Hermans SM, Buckley HL, Case BS, Curran-Cournane F, Taylor M, Lear G. Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Applied and environmental microbiology.* 2016. doi:10.1128/AEM.02826-16
 33. Bottini R, Cassán F, Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65: 497–503. doi:10.1007/s00253-004-1696-1
 34. Viñas M, Sabaté J, Espuny MJ, Anna M, Vin M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily

- Creosote-Contaminated Soil Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote. *Appl Environ Microbiol* 2005,. 2005;71: 7008–7018. doi:10.1128/AEM.71.11.7008
35. Lovecka P, Pacovska I, Stursa P, Vrchotova B, Kochankova L, Demnerova K. Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil. *N Biotechnol. Elsevier B.V.*; 2015;32: 1–1. doi:10.1016/j.nbt.2014.07.003
 36. Gerardi MH. Wastewater Bacteria. *Wastewater Microbiology series*. 2006. doi:10.1038/sj.jid.5700604
 37. Denamur E, Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbiol*. 2006;60: 820–827. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x
 38. Ochman H, Lawrence JG, Groisman E a. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000;405: 299–304. doi:10.1038/35012500
 39. Seelig J, Becker D, Willer J, Greenberg R, Ward J, Choi S. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *Nejm*. 1987;304: 1511–8. doi:10.1056/NEJM199401273300403
 40. G.Guillot, A. Nevot GT. Recherche, dans le lait en nature de certains bactéries pathogènes pour l’Homme. *Rev Générales des Quest Laitières*. 1950;
 41. Øvreås L, Torsvik V. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microb Ecol*. 1998;36: 303–315. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852510>
 42. Curiel Yuste J, Fernandez-Gonzalez AJ, Fernandez-Lopez M, Ogaya R, Penuelas J, Lloret F. Functional diversification within bacterial lineages promotes wide functional overlapping between taxonomic groups in a Mediterranean forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;90: 54–67. doi:10.1111/1574-6941.12373
 43. Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environ Microbiol*. 2009;11: 960–970. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01821.x
 44. Monier JM, Demanèche S, Delmont TO, Mathieu A, Vogel TM, Simonet P. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Current Opinion in Microbiology*. 2011. pp. 229–235. doi:10.1016/j.mib.2011.04.010
 45. Wilkinson JF. Enrichment , Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. 1970; 205–218.
 46. Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem*. 2010;42: 878–887. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.019
 47. Loman NJ, Pallen MJ. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2015;13: 787–794. doi:10.1038/nrmicro3565
 48. Puchałka J, Oberhardt M a, Godinho M, Bielecka A, Regenhardt D, Timmis KN, et al. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput Biol*. 2008;4: e1000210. doi:10.1371/journal.pcbi.1000210
 49. Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, de la Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M, et al. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS One*. 2015;10: e0128272. doi:10.1371/journal.pone.0128272
 50. Yang SH, Cho JK, Lee SY, Abanto OD, Kim SK, Ghosh C, et al. Isolation and characterization of novel denitrifying bacterium *Geobacillus* sp. SG-01 strain from wood

- chips composted with swine manure. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2013;26: 1651–1658. doi:10.5713/ajas.2013.13184
51. Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes - a review. *Front Biosci.* 2012;4: 240–253. doi:http://dx.doi.org/10.2741/373
 52. Stewart EJ. Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol.* 2012;194: 4151–60. doi:10.1128/JB.00345-12
 53. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68: 669–685. doi:10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004
 54. Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM, Simonet P. Extraction of DNA from soil. *Eur J Soil Biol.* 2003;39: 183–190. doi:10.1016/S1164-5563(03)00033-5
 55. Roesch L, Fulthorpe R, Riva A, Casella G, Hadwin A, Kent A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 2007;1: 283–290. doi:10.1038/ismej.2007.53
 56. Siqueira JF, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SSM, Alves FRF, et al. Profiling of Root Canal Bacterial Communities Associated with Chronic Apical Periodontitis from Brazilian and Norwegian Subjects. *J Endod. American Association of Endodontists;* 2008;34: 1457–1461. doi:10.1016/j.joen.2008.08.037
 57. Tiedje JM. Diversity of Nitrite Reductase (nirK and nirS) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. *Society.* 2002;68: 1893–1900. doi:10.1128/AEM.68.4.1893
 58. Daniel R. The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15: 199–204. doi:10.1016/j.copbio.2004.04.005
 59. Delmont TO, Eren AM, Maccario L, Prestat E, Esen ÖC, Pelletier E, et al. Reconstructing rare soil microbial genomes using in situ enrichments and metagenomics. *Front Microbiol.* 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00358
 60. López-García P, Moreira D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res Microbiol.* 2008;159: 67–73. doi:10.1016/j.resmic.2007.11.019
 61. Gans J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. 2005;1387. doi:10.1126/science.1112665
 62. Lynch MDJ, Neufeld JD. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13: 217–229. doi:10.1038/nrmicro3400
 63. Delmont TO, Robe P, Clark I, Simonet P, Vogel TM. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods. Elsevier B.V.;* 2011;86: 397–400. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.013
 64. Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58: 2717–2722. doi:1444380
 65. Fortin N, Beaumier D, Lee K, Greer CW. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J Microbiol Methods.* 2004;56: 181–191. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.006
 66. Harry M, Gambier B, Bourezgui Y, Garnier-Sillam E. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from rich organic samples: interference with humic substances. *Analisis.* 1999;27: 439–441. doi:10.1051/analisis:1999270439
 67. Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, Brunel D, et al. Back to the future of soil metagenomics. *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00073
 68. Ishoey T, Woyke T, Stepanauskas R, Novotny M, Lasken RS. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11: 198–204. doi:10.1016/j.mib.2008.05.006

69. Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2012;10: 631–640. doi:10.1038/nrmicro2857
70. Warnecke F, Hugenholtz P. Building on basic metagenomics with complementary technologies. *Genome Biol.* 2007;8: 231. doi:10.1186/gb-2007-8-12-231
71. Pivetal J. Développement et premières applications d'une méthode de tri de cellules bactériennes par marquage de l'ADN avec des nanoparticules magnétiques pour l'étude de la diversité bactérienne environnementale et des transferts horizontaux de gènes in situ. 2013
72. Heywood, V.H. Watson R. Global Biodiversity Assessment.
73. Ufarté L, Potocki-Veronese G, Laville É. Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology. *Front Microbiol.* 2015;6: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00563
74. Woese CR. Bacterial Evolution. *Microbiology.* 1987;51: 221–271. doi:10.1139/m88-093
75. Xu J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: Concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol.* 2006;15: 1713–1731. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02882.x
76. Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 2010;3: 182–196. doi:10.1007/s11947-009-0202-2
77. Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL, Torsvik V, Goksyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria . High Diversity in DNA of Soil Bacteria. 1990;56: 782–787.
78. Skinner F a, Jones PCT, Mollison JE. A Comparison of a direct and a plate- counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *J Gen Microbiol.* 1952;2: 261–271.
79. Delmont TO, Simonet P, Vogel TM. Describing microbial communities and performing global comparisons in the 'omic era. *ISME J.* Nature Publishing Group; 2012;6: 1625–1628. doi:10.1038/ismej.2012.55
80. Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Bates ST, Lauber CL, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109: 21390–21395. doi:10.1073/pnas.1215210110
81. Wang D, Bodovitz S. Single cell analysis: the new frontier in “omics”. *Trends Biotechnol.* 2010;28: 281–90. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.002
82. Kirk JL, Beaudette L a, Hart M, Moutogliss P, Klironomos JN, Lee H, et al. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods.* 2004;58: 169–88. doi:10.1016/j.mimet.2004.04.006
83. Schloss PD, Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol.* 2006;2: 0786–0793. doi:10.1371/journal.pcbi.0020092
84. Duchaufour P. *Pédologie.* 1988;
85. Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res.* 2004;79: 7–31. doi:10.1016/j.still.2004.03.008
86. Bronick CJ, Lal R. Soil structure and management: A review. *Geoderma.* 2005;124: 3–22. doi:10.1016/j.geoderma.2004.03.005
87. Vos M, Wolf AB, Jennings SJ, Kowalchuk GA. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37: 936–954. doi:10.1111/1574-6976.12023
88. Skopp J, Jawson MD, Doran JW. Steady-State Aerobic Microbial Activity as a Function of Soil Water Content. *Soil Sci Soc Am J.* 1990;54: 1619. doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400060018x

89. Linn DM, Doran JW. Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Sci Soc Am J.* 1984;48: 1267–1272. doi:10.2136/sssaj1984.03615995004800060013x
90. Liu J, Li J, Feng L, Cao H, Cui Z. An improved method for extracting bacteria from soil for high molecular weight DNA recovery and BAC library construction. *J Microbiol.* 2010;48: 728–733. doi:10.1007/s12275-010-0139-1
91. Bertaux J, Gloger U, Schmid M, Hartmann a., Scheu S. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. *J Microbiol Methods.* 2007;69: 451–460. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.012
92. Sitaula BK, Almås Å, Bakken LR, Singh BR, Alma Ê. Assessment of heavy metals associated with bacteria in soil. *Soil Biol Biochem.* 1999;31: 315–316.
93. Almås ÅR, Bakken LR, Mulder J. Changes in tolerance of soil microbial communities in Zn and Cd contaminated soils. *Soil Biol Biochem.* 2004;36: 805–813. doi:10.1016/j.soilbio.2004.01.010
94. Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol.* 2001;43: 1–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381954>
95. Böckelmann U, Szewzyk U, Grohmann E. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J Microbiol Methods.* 2003;55: 201–211. doi:10.1016/S0167-7012(03)00144-1
96. Lindahl V, Bakken LR. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 1995;16: 135–142. doi:10.1111/j.1574-6941.1995.tb00277.x
97. Mills AL. Keeping in Touch: Microbial Life on Soil Particle Surfaces. *Adv Agron.* 2001;78: 1–43. doi:10.1016/S0065-2113(02)78001-2
98. Ehlers K, Bünemann EK, Oberson A, Frossard E, Frostegård Å, Yuejian M, et al. Extraction of soil bacteria from a Ferralsol. *Soil Biol Biochem.* 2008;40: 1940–1946. doi:10.1016/j.soilbio.2008.04.005
99. Bakken LR. Separation and Purification of Bacteria from Soil. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49: 1482–1487.
100. Gossett DR, Weaver WM, MacH AJ, Hur SC, Tse HTK, Lee W, et al. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397: 3249–3267. doi:10.1007/s00216-010-3721-9
101. Cho JC, Tiedje JM. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66: 5448–5456. doi:10.1128/AEM.66.12.5448-5456.2000
102. Schüler D, Frankel RB. Bacterial magnetosomes: Microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;52: 464–473. doi:10.1007/s002530051547
103. Prosser JI, Tough AJ. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev Biotechnol.* 1991;10: 253–74. doi:10.3109/07388559109038211
104. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS1. 1990;238: 231–238.
105. Ferrari BC, Oregaard G, Sørensen SJ. Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting using a benchtop flow cytometer. *Microb Ecol.* 2004;48: 239–245. doi:10.1007/s00248-003-1069-9
106. Gerdt G, Luedke G. FISH and chips: Marine bacterial communities analyzed by flow cytometry based on microfluidics. *J Microbiol Methods.* 2006;64: 232–240.

- doi:10.1016/j.mimet.2005.05.001
107. Owen CS, Sykes NL. Magnetic labeling and cell sorting. *J Immunol Methods*. 1984;73: 41–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(84)90029-2
 108. Solden L, Lloyd K, Wrighton K. ScienceDirect The bright side of microbial dark matter : lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol*. Elsevier Ltd; 2016;31: 217–226. doi:10.1016/j.mib.2016.04.020
 109. Cébron A, Norini MP, Beguiristain T, Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods*. 2008;73: 148–159. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009
 110. Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117: 430–435. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.034
 111. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11: 142–201.
 112. Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1997;26: 1S–11S. doi:10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x
 113. Jin M, Lang J, Shen ZQ, Chen ZL, Qiu ZG, Wang XW, et al. A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food *E. coli* O157:H7 contamination. *PLoS One*. 2012;7: 2–8. doi:10.1371/journal.pone.0031352
 114. Bukhari Z, McCuin RM, Fricker CR, Clancy JL. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64: 4495–9.
 115. Tu SI, Reed S, Gehring A, He Y, Paoli G. Capture of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic beads of different size and antibody conjugating chemistry. *Sensors*. 2009;9: 713–730. doi:10.3390/s90200717
 116. Christensen B, Torsvik T, Lien T. Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from North Sea oil field waters. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58: 1244–1248.
 117. Coons AH, Creech HJ, Jones NR. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc* 1941; 200–202. doi:10.3181/00379727-47-13084P
 118. COONS AH, KAPLAN MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*. 1950;91: 1–13. doi:10.1084/jem.91.1.1
 119. P. N. HOBSON AKD S. O. MANN. Some Studies on the Identification of Rumen Bacteria with Fluorescent Antibodies. *J Gen Microbiol*. 1957;16: 463–471.
 120. Schlöter M, Abmus B, Hartmann a. the Use of Immunological Methods To Detect and. *Biotech Adv*. 1995;13: 75–90.
 121. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;64: 600–4. doi:10.1073/pnas.64.2.600
 122. Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol*. 1988;170: 720–726.
 123. Landegent JE, De Wal NJI, Baan RA, Hoeijmakers JHJ, Van Der Ploeg M. 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res*. 1984;153: 61–72. doi:10.1016/0014-

- 4827(84)90448-8
124. DeLong E, Wickham G, Pace N. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* (80-). 1989;243: 1360–1363. doi:10.1126/science.2466341
 125. Amann RI, Krumholz L, Stahl D a. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol.* 1990;172: 762–770.
 126. Wagner M, Smidt H, Loy A, Zhou J. Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: Challenges and future directions. *Microb Ecol.* 2007;53: 498–506. doi:10.1007/s00248-006-9197-7
 127. Wagner M, Haider S. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23: 96–102. doi:10.1016/j.copbio.2011.10.010
 128. Sommerfeld S, Strube J. Challenges in biotechnology production - Generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chem Eng Process Process Intensif.* 2005;44: 1123–1137. doi:10.1016/j.cep.2005.03.006
 129. Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, et al. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77: 1315–24. doi:10.1128/AEM.01526-10
 130. Delmont TO, Malandain C, Prestat E, Larose C, Monier J-M, Simonet P, et al. Metagenomic mining for microbiologists. *ISME J.* 2011;5: 1837–1843. doi:10.1038/ismej.2011.61
 131. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2005;2: 905–909. doi:10.1038/nmeth819
 132. Gerdes H-H, Kaether C. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS lett.* 1996;389: 44–47.
 133. Valdivia RH, Hromockyj a E, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene.* 1996;173: 47–52. doi:0378111995007067 [pii]
 134. Njoloma JP, Oota M, Saeki Y, Akao S. Detection of gfp expression from gfp-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues. *African J Biotechnol.* 2005;4: 1372–1377.
 135. Sørensen S ø J, Sørensen AH, Hansen LH, Oregaard G, Veal D. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. *Curr Microbiol.* 2003;47: 129–133. doi:10.1007/s00284-002-3978-0
 136. Zhang D, Berry JP, Zhu D, Wang Y, Chen Y, Jiang B, et al. Magnetic nanoparticle-mediated isolation of functional bacteria in a complex microbial community. *Nature Publishing Group;* 2014;9: 603–614. doi:10.1038/ismej.2014.161
 137. Zhang D, Fakhrullin RF, Özmen M, Wang H, Wang J, Paunov VN, et al. Functionalization of whole-cell bacterial reporters with magnetic nanoparticles. 2011;4: 89–97. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00228.x
 138. Diaspro A, Silvano D, Krol S, Cavalleri O, Gliozzi A. Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells. *Langmuir.* 2002;18: 5047–5050. doi:10.1021/la025646e
 139. Amann R. Fluorescently labelled , rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol Ecol.* 1995;4: 543–554. doi:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00255.x
 140. Pernthaler A, Preston CM, Pernthaler J, Delong EF, Amann R. Comparison of Fluorescently Labeled Oligonucleotide and Polynucleotide Probes for the Detection of

- Pelagic Marine Bacteria and Archaea 2002; doi:10.1128/AEM.68.2.661
141. Moraru C, Moraru G, Fuchs BM, Amann R. Concepts and software for a rational design of polynucleotide probes. *Environ Microbiol Rep.* 2011;3: 69–78. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00189.x
 142. Trebesius K, Amann R, Ludwig W, Mühlegger K, Schleifer KH. Identification of Whole Fixed Bacterial Cells with Nonradioactive ²³S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60: 3228–35.
 143. Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1991;26: 227–259. doi:10.3109/10409239109114069
 144. Weisburg WG, Barns SM, Pelletie D a, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173: 697–703.
 145. Janssen PH. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 1719–1728. doi:10.1128/AEM.72.3.1719
 146. Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, et al. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1363–71. doi:10.1093/nar/gkh293
 147. Yilmaz LS, Parnerkar S, Noguera DR. MathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for in silico evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77: 1118–1122. doi:10.1128/AEM.01733-10
 148. Ashelford KE, Weightman AJ, Fry JC. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 3481–3489. doi:10.1093/nar/gkf450
 149. Greuter D, Loy A, Horn M, Rattei T. probeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes and primers: new features 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D586–D589. doi:10.1093/nar/gkv1232
 150. Loy A, Arnold R, Tischler P, Rattei T, Wagner M, Horn M. probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol.* 2008;10: 2894–8. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01706.x
 151. Kubota K, Ohashi A, Imachi H, Harada H. Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 5311–7. doi:10.1128/AEM.03039-05
 152. Wengel J. Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc Chem Res.* 1999;32: 301–310. doi:10.1021/ar980051p
 153. Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24: 555–565.
 154. Olsen GJ. Microbial Ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40: 337–365. doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.002005
 155. Noller H. Structure of Ribosomal RNA. *Annu Rev Biochem.* 1984;53: 119–162. doi:10.1146/annurev.biochem.53.1.119
 156. Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol.* 1999;22: 434–44. doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8

157. Noller H. Structure of Ribosomal RNA. *Annu Rev Biochem.* 1984;53: 119–162. doi:10.1146/annurev.biochem.53.1.119
158. Behnam F, Vilcinskas A, Wagner M, Stoecker K. A straightforward DOPE (double labeling of oligonucleotide probes)-FISH (fluorescence in situ hybridization) method for simultaneous multicolor detection of six microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78: 5138–42. doi:10.1128/AEM.00977-12
159. Schimak MP, Kleiner M, Wetzel S, Liebeke M, Dubilier N, Fuchs M. MiL-FISH: Multilabeled Oligonucleotides for Fluorescence In Situ Hybridization Improve Visualization of Bacterial Cells. 2016;82: 62–70. doi:10.1128/AEM.02776-15.Editor
160. Kalyuzhnaya MG, Zabinsky R, Bowerman S, Baker DR, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 4293–301. doi:10.1128/AEM.00161-06
161. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: 141–145. doi:10.1093/nar/gkn879
162. Ludwig W, Dorn S, Springer N, Kirchhof G, Schleifer KH. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60: 3236–44.
163. Pratscher J, Stichternoth C, Fichtl K, Schleifer K-H, Braker G. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75: 802–10. doi:10.1128/AEM.01992-08
164. Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer K-H. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH. *Mol Microbiol.* 2003;51: 89–96. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03834.x
165. Hoshino T, Schramm A. Detection of denitrification genes by in situ rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells. *Environ Microbiol.* 2010;12: 2508–2517. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02224.x
166. Kawakami S, Kubota K, Imachi H, Yamaguchi T, Harada H, Ohashi A. Detection of single copy genes by two-pass tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization (Two-Pass TSA-FISH) with single oligonucleotide probes. *Microbes Environ.* 2010;25: 15–21. doi:10.1264/jsme2.ME09180
167. Moraru C, Lam P, Fuchs BM, Kuypers MMM, Amann R. GeneFISH--an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environ Microbiol.* 2010;12: 3057–73. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02281.x
168. Pernthaler A, Amann R. Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70: 5426–5433. doi:10.1128/AEM.70.9.5426
169. Yilmaz S, Haroon MF, Rabkin B a, Tyson GW, Hugenholtz P. Fixation-free fluorescence in situ hybridization for targeted enrichment of microbial populations. *ISME J. Nature Publishing Group;* 2010;4: 1352–1356. doi:10.1038/ismej.2010.73
170. Stoffels M, Ludwig W, Schleifer KH. rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environ Microbiol.* 1999;1: 259–71. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207744>
171. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for

- detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 2557–2564.
172. Pivetal J, Toru S, Frenea-Robin M, Haddour N, Cecillon S, Dempsey NM, et al. Selective isolation of bacterial cells within a microfluidic device using magnetic probe-based cell fishing. *Sensors Actuators B Chem. Elsevier B.V.;* 2014;195: 581–589. doi:10.1016/j.snb.2014.01.004
 173. Zarda B. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled rRNA-targeted oligonucleotides. *J Gen Microbiol.* 1991;137: 2823–2830.
 174. Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry.* 1993;14: 136–43. doi:10.1002/cyto.990140205
 175. Stoecker K, Dorninger C, Daims H, Wagner M. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 922–6. doi:10.1128/AEM.02456-09
 176. Chuto G, Chaumet-Riffaud P. Les nanoparticules. *Med Nucl.* 2010;34: 370–376. doi:10.1016/j.mednuc.2010.03.003
 177. Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68: 3094–3101. doi:10.1128/AEM.68.6.3094
 178. Kubota K. CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. *Microbes Environ.* 2012;28: 3–12. doi:10.1264/jsme2.ME12107
 179. Tsuyoshi Y, Kawakami S, Hatamoto M, Imachi H, Takahashi M, Araki N, et al. In situ DNA-HCR: A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms. *Environ Microbiol.* 2014;17: 2532–2541. doi:10.1111/1462-2920.12745
 180. Larsson C, Koch J, Nygren A, Janssen G, Raap AK, Landegren U, et al. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nat Methods.* 2004;1: 227–232. doi:10.1038/nmeth723
 181. Dirks RM, Pierce NA. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 15275–8. doi:10.1073/pnas.0407024101
 182. DeLong EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM, Long EFDE. Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and. 1999;
 183. Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer K-H. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26: 327–37. doi:10.1078/072320203322497356
 184. Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer K. Improved Method for Polynucleotide Probe-Based Cell Sorting , Using DNA-Coated Microplates. 2004;70. doi:10.1128/AEM.70.1.494
 185. Pivetal J, Royet D, Ciuta G, Frenea-Robin M, Haddour N, Dempsey NM, et al. Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning. *J Magn Magn Mater. Elsevier;* 2015;380: 72–77. doi:10.1016/j.jmmm.2014.09.068
 186. Pivetal J, Ciuta G, Frenea-Robin M, Haddour N, Dempsey NM, Dumas-Bouchiat F, et al. Magnetic nanoparticle DNA labeling for individual bacterial cell detection and recovery. *J Microbiol Methods. Elsevier B.V.;* 2014;107: 84–91. doi:10.1016/j.mimet.2014.09.006

187. Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T, Orphan VJ. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. 2008;
188. Trembath-reichert E, Green-saxena A, Orphan VJ. Whole Cell Immunomagnetic Enrichment of Environmental Microbial Consortia Using. 2013;531: 21–44.
189. Fang, Zhang. Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications. *J Mater Chem*. 2009;19: 6258–6266. doi:10.1039/b902182e
190. Gijs MA, Lacharme F, Lehmann U. Microfluidic Applications of Magnetic Particles for Biological Analysis and Catalysis. *Chem Rev*. 2010;110: 1518–1563. doi:Doi 10.1021/Cr9001929
191. Roh Y, Lauf RJ, McMillan AD, Zhang C, Rawn CJ, Bai J, et al. Microbial synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites. *Solid State Commun*. 2001;118: 529–534. doi:10.1016/S0038-1098(01)00146-6
192. Inglis DW, Riehn R, Sturm JC, Austin RH. Microfluidic high gradient magnetic cell separation. *J Appl Phys*. 2006;99: 99–101. doi:10.1063/1.2165782
193. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64: 109–130. doi:10.1007/s10616-011-9415-0
194. Kalisky T, Quake SR. Single-cell genomics. 2011;8: 311–314.
195. Porter J, Edwards C, Morgan J a, Pickup RW. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59: 3327–33.
196. Mota CR, So MJ, de los Reyes FL. Identification of Nitrite-Reducing Bacteria Using Sequential mRNA Fluorescence In Situ Hybridization and Fluorescence-Assisted Cell Sorting. *Microb Ecol*. 2012;64: 256–267. doi:10.1007/s00248-012-0018-x
197. Van Nevel S, Koetzsch S, Weilenmann HU, Boon N, Hammes F. Routine bacterial analysis with automated flow cytometry. *J Microbiol Methods*. Elsevier B.V.; 2013;94: 73–76. doi:10.1016/j.mimet.2013.05.007
198. Podar M, Abulencia CB, Walcher M, Hutchison D, Zengler K, Garcia J a, et al. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 3205–14. doi:10.1128/AEM.02985-06
199. Kametsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*. 1965;150: 630–631. doi:10.1126/science.150.3696.630
200. Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol*. 1999;17: 1109–11. doi:10.1038/15095
201. Ateya DA, Erickson JS, Howell PB, Hilliard LR, Golden JP, Ligler FS. The good, the bad, and the tiny: A review of microflow cytometry. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391: 1485–1498. doi:10.1007/s00216-007-1827-5
202. Cho SH, Chen CH, Tsai FS, Godin JM, Lo Y-H. Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro- fabricated fluorescence-activated cell sorter (μ FACS). *Lab Chip*. 2010;10: 1567–1573. doi:10.1039/c000136h.Human
203. Christensen H, Hansen M. Counting and Size Classification of Active Soil Bacteria by Fluorescence In Situ Hybridization with an rRNA Oligonucleotide Probe. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65: 1753–1761.
204. Choi JW, Liakopoulos TM, Ahn CH. An on-chip magnetic bead separator using spiral electromagnets with semi-encapsulated permalloy. *Biosens Bioelectron*. 2001;16: 409–16.
205. Sorli B, Chateaux JF, Pitaval M, Chahboune H, Favre B, Briguet A, et al. Micro-

- spectrometer for NMR: Analysis of small quantities in vitro. *Meas Sci Technol*. 2004;15: 877–880. doi:10.1088/0957-0233/15/5/013
206. Inglis DW, Riehn R, Austin RH, Sturm JC. Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation. *Appl Phys Lett*. 2004;85: 5093–5095. doi:10.1063/1.1823015
 207. Ramadan Q, Samper V, Poenar D, Yu C. On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation. *J Magn Magn Mater*. 2004;281: 150–172. doi:10.1016/j.jmmm.2004.04.100
 208. Ryu KS, Shaikh K, Goluch E, Fan Z, Liu C. Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab Chip*. 2004;4: 608–13. doi:10.1039/b403305a
 209. Hoshino K, Huang Y-Y, Lane N, Huebschman M, Uhr JW, Frenkel EP, et al. Microchip-based Immunomagnetic Detection of Circulating Tumor Cell. *Lab Chip*. 2011;11: 3449–3457. doi:10.1039/b000000x/Hoshino
 210. Lee H, Purdon AM, Chu V, Westervelt RM. Controlled assembly of magnetic nanoparticles from magnetotactic bacteria using microelectromagnets arrays. *Nano Lett*. 2004;4: 995–998. doi:10.1021/nl049562x
 211. Ramadan Q, Poenar DP, Yu C. Customized trapping of magnetic particles. *Microfluid Nanofluidics*. 2009;6: 53–62. doi:10.1007/s10404-008-0296-2
 212. Deng T, Prentiss M, Whitesides GM. Fabrication of magnetic microfiltration systems using soft lithography. *Appl Phys Lett*. 2002;80: 461. doi:10.1063/1.1436282
 213. Gray BL. A Review of Magnetic Composite Polymers Applied to Microfluidic Devices. *J Electrochem Soc*. 2014;161: B3173–B3183. doi:10.1149/2.023402jes
 214. Dumas-Bouchiat F, Zanini LF, Kustov M, Dempsey NM, Grechishkin R, Hasselbach K, et al. Thermomagnetically patterned micromagnets. *Appl Phys Lett*. 2010;96: 1–4. doi:10.1063/1.3341190
 215. Pivetal J. Développement et premières applications d'une méthode de tri de cellules bactériennes par marquage de l'ADN avec des nanoparticules magnétiques pour l'étude de la diversité bactérienne environnementale et des transferts horizontaux de gènes in situ.
 216. Torsvik L. VO. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5: 240–245.
 217. McConaughy BL, Laird CD, McCarthy BJ. Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry*. 1969;8: 3289–3295. doi:10.1021/bi00836a024
 218. Ku WC, Lau WK, Tseng YT, Tzeng CM, Chiu SK. Dextran sulfate provides a quantitative and quick microarray hybridization reaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315: 30–37. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.013
 219. Amasino RM. Acceleration of Nucleic Acid Hybridization Rare by Polyethylene Glycol. *Anal Biochem*. 1986;152: 304–307.
 220. Lavery PE, Kowalczykowski SC. Enhancement of recA protein-promoted DNA strand exchange activity by volume-occupying agents. *J Biol Chem*. 1992;267: 9307–9314.
 221. St-Laurent J, Boulay ME, Prince P, Bissonnette E, Boulet LP. Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: An immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods*. 2006;308: 36–42. doi:10.1016/j.jim.2005.09.019
 222. Yamaguchi T, Fuchs BM, Amann R, Kawakami S, Kubota K, Hatamoto M, et al. Rapid and sensitive identification of marine bacteria by an improved in situ DNA hybridization chain reaction (quickHCR-FISH). *Syst Appl Microbiol*. Elsevier GmbH.; 2015;38: 400–405. doi:10.1016/j.syapm.2015.06.007
 223. Nelson KE, Weinell C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos V a P, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile

- Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 2002;4: 799–808.
224. Osman O, Toru S, Dumas-Bouchiat F, Dempsey NM, Haddour N, Zanini L-F, et al. Microfluidic immunomagnetic cell separation using integrated permanent micromagnets. *Biomicrofluidics.* 2013;7: 54115. doi:10.1063/1.4825395
 225. Park JW, Crowley DE. Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification real-time PCR and of target genes by DGGE. *Biotechniques.* 2005;38: 579–586. doi:10.2144/05384ST04
 226. Yamaguchi T, Fuchs BM, Amann R, Kawakami S, Kubota K, Hatamoto M, et al. Rapid and sensitive identification of marine bacteria by an improved in situ DNA hybridization chain reaction (quickHCR-FISH). *Syst Appl Microbiol.* Elsevier GmbH.; 2015;38: 400–405. doi:10.1016/j.syapm.2015.06.007
 227. Wagner M, Erhart R, Manz W, Amann R, Lemmer H, Wedi D, et al. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60: 792–800.
 228. Dirks RM, Pierce N a. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 15275–15278. doi:10.1073/pnas.0407024101
 229. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. 2013; 1–28.
 230. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Na??ve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73: 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
 231. Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 2014;30: 3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494
 232. Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33: 17–20. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00938.x
 233. Courtois S, Frostegård Å, Göransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P. Quantification of bacterial subgroups in soil: Comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol.* 2001;3: 431–439. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00208.x
 234. Bruder LM, Dörkes M, Fuchs BM, Ludwig W, Liebl W. Flow cytometric sorting of fecal bacteria after in situ hybridization with polynucleotide probes. *Syst Appl Microbiol.* Elsevier GmbH; 2016; doi:10.1016/j.syapm.2016.08.005
 235. Gasc C, Peyretaillade E, Peyret P. Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: 4504–4518. doi:10.1093/nar/gkw309
 236. Grodzinski P, Yang J, Liu RH, Ward MD. A modular microfluidic system for cell pre-concentration and genetic sample preparation. *Biomed Microdevices.* 2003;5: 303–310. doi:10.1023/A:1027357713526
 237. Lecault V, White AK, Singhal A, Hansen CL. Microfluidic single cell analysis: From promise to practice. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16: 381–390. doi:10.1016/j.cbpa.2012.03.022
 238. Pamme N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip.* 2006;6: 24–38. doi:10.1039/b513005k
 239. Pamme N, Wilhelm C. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab Chip.* 2006;6: 974–80. doi:10.1039/b604542a
 240. Pamme N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab Chip.* 2007;7: 1644.

- doi:10.1039/b712784g
241. Blankenstein G, Larsen UD. Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis. *Biosens Bioelectron.* 1998;13: 427–438. doi:10.1016/S0956-5663(97)00109-7
 242. Hejazian M, Li W, Nguyen N-T. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. *Lab Chip. Royal Society of Chemistry;* 2015;15: 959–970. doi:10.1039/C4LC01422G
 243. Xia N, Hunt TP, Mayers BT, Alsberg E, Whitesides GM, Westervelt RM, et al. Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. *Biomed Microdevices.* 2006;8: 299–308. doi:10.1007/s10544-006-0033-0
 244. Adams JD, Kim U, Soh HT. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 18165–18170. doi:10.1073/pnas.0809795105
 245. Harrison DJ, Manz A, Fan Z, Lue di H, Widmer HM. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem.* 1992;64: 1926–1932. doi:10.1021/ac00041a030
 246. Harrison DJ, Fluri K, Seiler K, Fan ZH, Effenhauser CS, Manz A. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on a Chip. *Science (80-).* 1993;261: 895–897. doi:10.1126/science.261.5123.895
 247. Becker H, Locascio LE. Polymer microfluidic devices. *Talanta.* 2002;56: 267–287. doi:10.1016/S0039-9140(01)00594-X
 248. Madou, M. J., Y. Lu, S. Lai, L. J. Lee and SD. A Centrifugal Microfluidic Platform: A Comparison. *Proc MicroTAS 2000 Symp.* 2000; 565–570.
 249. Olsen KG, Ross DJ, Tarlov MJ. Immobilization of DNA hydrogel plugs in microfluidic channels. *Anal Chem.* 2002;74: 1436–1441. doi:10.1021/ac0156969
 250. Wang J, Pumera M, Chatrathi MP, Escarpa A, Konrad R, Griebel A, et al. Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. *Electrophoresis.* 2002;23: 596–601. doi:10.1002/1522-2683(200202)23:4<596::AID-ELPS596>3.0.CO;2-C
 251. Locascio LE, Perso CE, Lee CS. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluidic devices and the effect of protein adsorption on flow rate. *J Chromatogr A.* 1999;857: 275–284. doi:10.1016/S0021-9673(99)00774-8
 252. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 1998;70: 4974–4984. doi:10.1021/ac980656z
 253. Whitesides GM, Ostuni E, Jiang X, Ingber DE. Soft Lithography in Biology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2001;3: 335–73. doi:10.1146/annurev.bioeng.3.1.335
 254. Delamarche E, Bernard A, Schmid H, Michel B, Biebuyck H. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science.* 1997;276: 779–781. doi:10.1126/science.276.5313.779
 255. McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Wu H, Schueller OJ, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis.* 2000;21: 27–40. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C
 256. Owen MJ, Stasser JL. Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *Am Chem Soc Polym Prepr Div Polym Chem.* 1997;38: 1087–1088. doi:10.1163/156856194X00942
 257. Brun M, Claude LU, Lyon B. Electrodes nanocomposites pour applications en microfluidique Electrodes. 2012;
 258. Sakar MS, Steager EB, Kim DH, Kim MJ, Pappas GJ, Kumar V. Single cell manipulation

- using ferromagnetic composite microtransporters. *Appl Phys Lett*. 2010;96. doi:10.1063/1.3293457
259. Gusenbauer M, Özelt H, Fischbacher J, Reichel F, Exl L, Bance S, et al. Simulation of magnetic active polymers for versatile microfluidic devices. *EPJ Web Conf*. 2013;40: 2001. doi:10.1051/epjconf/20134002001
 260. Faivre M, Gelszinnis R, Degouttes J, Terrier N, Rivière C, Ferrigno R, et al. Magnetophoretic manipulation in microsystem using carbonyl iron-polydimethylsiloxane microstructures. *Biomicrofluidics*. 2014;8: 54103. doi:10.1063/1.4894497
 261. Mustin B, Stoeber B. Low cost integration of 3D-electrode structures into microfluidic devices by replica molding. *Lab Chip*. 2012;12: 4702. doi:10.1039/c2lc40728k
 262. Teste B, Jamond N, Ferraro D, Viovy J-L, Malaquin L. Selective handling of droplets in a microfluidic device using magnetic rails. *Microfluid Nanofluidics*. 2015;19: 141–153. doi:10.1007/s10404-015-1556-6
 263. Deman A-L, Brun M, Quatresous M, Chateaux J-F, Frenea-Robin M, Haddour N, et al. Characterization of C-PDMS electrodes for electrokinetic applications in microfluidic systems. *J Micromechanics Microengineering*. 2011;21: 1–8. doi:10.1088/0960-1317/21/9/095013
 264. Mustin B, Stoeber B. Low cost integration of 3D-electrode structures into microfluidic devices by replica molding. *Lab Chip*. 2012;12: 4702. doi:10.1039/c2lc40728k
 265. Zanini L. Structures magnetiques et micro-systemes pour applications biologiques basés sur des aimants permanents. 2013;
 266. Plecis A, Chen Y. Fabrication of microfluidic devices based on glass-PDMS-glass technology. *Microelectron Eng*. 2007;84: 1265–1269. doi:10.1016/j.mee.2007.01.276
 267. Puttaswamy SV, Xue P, Kang Y, Ai Y. Simple and low cost integration of highly conductive three-dimensional electrodes in microfluidic devices. *Biomed Microdevices*. 2015;17. doi:10.1007/s10544-014-9913-x
 268. Siegel AC, Shevkoplyas SS, Weibel DB, Bruzewicz DA, Martinez AW, Whitesides GM. Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Angew Chemie - Int Ed*. 2006;45: 6877–6882. doi:10.1002/anie.200602273
 269. Zhou R, Wang C. Microfluidic separation of magnetic particles with soft magnetic microstructures. *Microfluid Nanofluidics*. Springer Berlin Heidelberg; 2016; 1–11. doi:10.1007/s10404-016-1714-5
 270. Vézy C, Haddour N, Dempsey NM, Dumas-Bouchiat F, Frenea-Robin M. Simple method for reversible bonding of a polydimethylsiloxane microchannel to a variety of substrates. *Micro Nano Lett*. 2011;6: 871. doi:10.1049/mnl.2011.0492
 271. Menad S, El-Gaddar A, Haddour N, Toru S, Brun M, Buret F, et al. From Bipolar to Quadrupolar Electrode Structures: An Application of Bond-Detach Lithography for Dielectrophoretic Particle Assembly. *Langmuir*. 2014;30: pp 5686–5693. doi:10.1021/la5005193
 272. Dias A. Développement d'un système magneto-optique à balayage jusqu'à 10 T pour la caractérisation de couches magnétiques dures à gradient de composition. 2016;
 273. Li J, Zhang M, Wang L. Design and fabrication of microfluidic mixer from carbonyl iron – PDMS composite membrane. *Microfluid Nanofluidics*. 2011;10: 919–925. doi:10.1007/s10404-010-0712-2
 274. Chadebec O, Coulomb JL, Janet F. A review of magnetostatic moment method. *IEEE Trans Magn*. 2006;42: 515–520. doi:10.1109/TMAG.2006.870929
 275. Chetouani HL. microsystemes et micromanipulation a levitation diamagnetique conception,

realisation et application : 2008;

Titre : Développement de techniques d'hybridation *in situ* magnétiques pour le marquage et la capture sélective de bactéries en vue de l'étude de la biodiversité bactérienne environnementale.

Résumé : Les bactéries, organismes les plus abondants de notre planète, ont un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes. En dépit de leur importance, la caractérisation des communautés bactériennes (microbiotes) demeure encore aujourd'hui très incomplète. Ceci a pour origine l'impossibilité de complètement décrypter taxonomiquement et fonctionnellement les microbiotes de ces écosystèmes et donc à appréhender la diversité bactérienne dans son ensemble que ce soit par des approches culturales (avec seulement 1% de bactéries cultivables) ou par des approches métagénomiques limitées par les biais d'extraction, de séquençage et d'analyse. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse visent à développer une nouvelle voie exploratoire passant par le fractionnement des microbiotes afin d'en étudier séparément les génomes des différentes populations ou groupes de populations, leur somme devant permettre de reconstituer un métagénome complet. Cet objectif requiert le développement d'un outil pour la sélection spécifique de bactéries (sur des critères taxonomiques ou fonctionnels) et leur isolement du reste des microorganismes non ciblés. Les travaux de thèse ont porté sur le développement d'une approche de marquage magnétique des bactéries basée sur l'hybridation moléculaire (hybridation *in situ*) complétée par celui d'un outil de tri microfluidique. Deux méthodes ont été développées, MISH et HCR, ciblant le gène de l'ARNr 23S, chacune reposant sur la formation, lors du processus d'hybridation, d'une structure secondaire en arborescence (MISH) ou ordonnée (HCR) permettant le greffage de nanoparticules magnétiques. Les résultats obtenus illustrent le potentiel des deux approches d'abord pour le marquage spécifique de bactéries cibles (*E.coli* et *Pseudomonas putida*) en conditions de culture au laboratoire puis dans un second temps dans des échantillons de sol. Le tri microfluidique a également été optimisé par le développement d'un nouveau dispositif de tri magnétique permettant la séparation des cellules marquées sous flux continu faisant appel à l'injection d'un polymère composite magnétique pour intégrer au fond du microcanal une série de bandes parallèles magnétiques. La fonctionnalité du dispositif a été démontrée, sa simplicité de fabrication en faisant un outil de choix pour une application en routine dans les laboratoires d'écologie microbienne. En dépit de résultats prometteurs toute cette nouvelle approche d'étude de la diversité bactérienne environnementale nécessite encore de nombreuses étapes d'optimisation.

Mots clés : hybridation *in situ*, écologie microbienne, tri cellulaire, microsystèmes, magnétisme

Title: Development of magnetic *in situ* hybridization technics for labelling and selective capture of bacteria for the study of environmental bacterial biodiversity.

Abstract: Bacteria, the most abundant organisms on our planet, have a fundamental role in ecosystem functioning. Despite their importance, the characterization of bacterial communities is today still incomplete. This is due to the impossibility of completely decomposing taxonomically and functionally the microbial communities of these ecosystems and as a consequence to apprehend the whole bacterial diversity, either by cultural approaches (with only 1% of culturable bacteria) or by metagenomic, a limited approaches cause by biases in extraction, sequencing and analysis. The work undertaken in this thesis aims to develop a new exploratory pathway through the fractionation of microbiota in order to study separately genomes of different populations or groups of populations. Their sum should enable reconstitution of complete metagenome. This objective requires the development of a tool for the specific selection of bacteria (on taxonomic or functional criteria) and their isolation from the rest of the non-target microorganisms. The thesis work focused on the development of a magnetic labeling approach for bacteria based on molecular hybridization (*in situ* hybridization) complete by development of a microfluidic cell-sorting tool. Two methods have been developed, MISH and HCR, targeting the 23S rRNA gene, each based on the formation, during the hybridization process, of a secondary random structure (MISH) or organized structure (HCR) enabling binding to magnetic nanoparticles. Results obtained illustrate the potential of the two approaches initially for the specific labeling of target bacteria (*E.coli* and *Pseudomonas putida*) under laboratory conditions and then in soil samples. The microfluidic sorting was also optimized by the development of a novel magnetic cell-sorting device allowing the separation of the labeled cells under continuous flow using the injection of a magnetic composite polymer to integrate a series of magnetic parallel strips at the bottom of the microchannel. The proper functioning of the sorting device has been demonstrated, its simple production making it a tool of choice for a routine application in laboratories of microbial ecology. Despite promising results all this new approach for studying environmental bacterial diversity is still requiring many optimization steps.

Key words: *in situ* hybridization, microbial ecology, cell-sorting, microsystems, magnetism