

Projet ANR-09-CESA-013

EMERGENT

Programme CES2009

Acronyme du projet	Emergent
Titre du projet	Développement et application d'une méthode de marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques pour définir le rôle des transferts horizontaux de gènes entre bactéries dans les processus de bio-atténuation des polluants du sol.
Coordinateur du projet (société/organisme)	Pascal Simonet – Laboratoire AMPERE, Ecole Centrale de Lyon
Période du projet (date de début – date de fin)	Date de début : 1 ^{er} novembre 2009 Date de fin : 30 avril 2013
Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	<ul style="list-style-type: none">• Laboratoire AMPERE/ Pascal Simonet• G2Elab/Gilbert Reyne• Institut Néel/Nora Dempsey• IPCMS/Geneviève Pourroy

RESUME CONSOLIDE PUBLIC

Génomique de la cellule bactérienne isolée via l'emploi de microsystemes magnétiques

Nouvelle approche technologique d'étude de la diversité bactérienne environnementale et des transferts horizontaux de gènes in situ.

Le séquençage de très nombreux génomes bactériens a permis de révéler le rôle fondamental du transfert horizontal de gènes entre cellules de même génération pour l'adaptation bactérienne et l'évolution des génomes. Le transfert de gènes pose problème quand il induit la dissémination de gènes de résistance à des antibiotiques mais trouve son utilité quand il favorise la dégradation de molécules toxiques comme peuvent l'être certains pesticides xénobiotiques. L'étude in situ du transfert de l'information génétique entre bactéries, aussi bien pour en comprendre fondamentalement les implications évolutives et adaptatives que pour tenter de les contrôler (accélérer la dégradation des polluants, éviter la dissémination des gènes de résistance à des antibiotiques) nécessite le recours aux toutes dernières technologies d'investigation. Afin de permettre le suivi des transferts de gènes entre bactéries du sol et l'identification des bactéries réceptrices impliquées dans ces transferts (y compris celles appartenant à l'immense réservoir des non cultivables), nous proposons une nouvelle technologie consistant à conférer des propriétés magnétiques aux bactéries en vue de leur isolement sélectif à l'aide de microaimants intégrés dans des dispositifs microfluidiques.

Marquage magnétique de l'ADN avant transformation pour permettre l'attraction sélective sur microaimants des bactéries transformées.

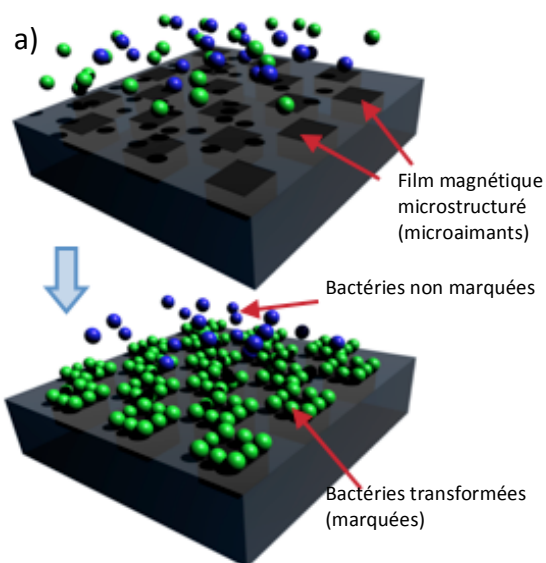
La méthodologie développée consiste à greffer des nanoparticules magnétiques sur des fragments d'ADN avant introduction dans les bactéries par électroporation. L'isolement des cellules transformées peut ainsi être réalisé à l'aide d'un réseau de microaimants attirant uniquement les bactéries ayant incorporé l'ADN marqué magnétiquement (les autres pouvant être éluées grâce à l'emploi de forces fluidiques). L'intensité de la force magnétique obtenue dépend des propriétés magnétiques des bactéries (conférées par les nanoparticules), ainsi que du gradient d'induction magnétique. Le premier facteur est limité par la taille des nanoparticules pouvant traverser les enveloppes de la cellule, mais compte-tenu des lois d'échelle, le second peut être considérablement augmenté en tirant parti de la miniaturisation des aimants. Aussi, l'optimisation conjointe des nanoparticules (taille/nombre) et des sources de champ (géométrie, dimensions, matériaux) constitue une étape majeure de ce projet. Chacune des cellules bactériennes isolées grâce aux microaimants peut ensuite être récupérée au moyen d'une pince optique, puis identifiée après extraction et séquençage de son ADN.

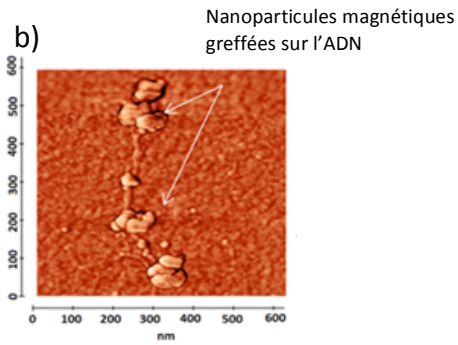
Résultats majeurs du projet

Le greffage des nanoparticules magnétiques sur l'ADN a été réalisé avec succès et des bactéries ayant internalisé de l'ADN marqué ont pu être attirées sur des films aimantés structurés. Des microaimants présentant des dimensions en rapport avec la taille des bactéries manipulées (carrés de quelques μm de côté) ont été fabriqués, et se sont révélés suffisamment performants pour permettre l'attraction de nanoparticules de 12 nm, également élaborées dans le cadre du projet. Un système microfluidique intégrant ces microaimants a été mis au point pour permettre le tri de bactéries marquées et non marquées. Ce système a permis d'isoler spécifiquement des bactéries présentes en faible quantité dans un mélange, notamment en exploitant le principe de l'hybridation in situ magnétique.

Production scientifique

Les résultats du projet Emergent ont été publiés dans des revues scientifiques internationales, relevant notamment des domaines de la physique et des microsystèmes, telles que *Journal of Applied Physics*, *Applied Physics Letters*, *Micro and Nano Letters*, *Biomedical Microdevices*. Etant donné les délais de parution des articles, de nombreuses autres publications sont encore attendues, ciblant davantage un public de microbiologistes. Les résultats du projet Emergent ont également été présentés par des communications orales ou affichées dans de nombreux congrès internationaux (*Magnetism and Magnetic Materials Conference*, *MicroTAS*, etc.).





a) Principe de l'attraction spécifique de bactéries transformées sur un réseau de microaimants. b) Image AFM d'un brin d'ADN marqué magnétiquement.

Informations factuelles

Le projet « Emergent » est un projet de recherche fondamentale coordonné par le laboratoire Ampère (Lyon). Il associe trois autres laboratoires CNRS : l'Institut Néel, le G2Elab (Grenoble) et l'IPCMS (Strasbourg). Le projet a débuté le 1er novembre 2009 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 550 k€ pour un coût global de 2,66 M€.