

Partie I

Etablissement d'inscription : Ecole Centrale de Lyon

École doctorale : ED 160 EEA de Lyon

Intitulé du doctorat : Ingénierie pour le vivant

Sujet de la thèse : « **Microglace** » - Développement de systèmes microfluidiques visant à caractériser les communautés microbiennes piégées dans les archives glacières

Unité de recherche : laboratoire Ampère

Directrice de thèse : Mme Larose Catherine (HDR)

Co-directrice de thèse : Mme Frénéa-Robin Marie (HDR)

Partie II

Domaine et contexte scientifiques

- Domaine et contexte scientifiques

Dans un contexte de changement global, il est essentiel de progresser dans notre compréhension du fonctionnement du système Terre afin d'anticiper au mieux ses évolutions futures, notamment climatiques. Les archives glaciaires (carottes de glace extraites aux hautes et moyennes latitudes) peuvent contribuer à cet effort significativement, en renseignant par exemple les évolutions passées de la composition atmosphérique ou des températures. En analysant les communautés microbiennes piégées dans ces archives il est possible d'extraire de l'information complémentaire aux mesures chimiques et physiques pour décrire les environnements passés.

- Mots-clefs

Microsystèmes, microfluidique, tri cellulaire, lyse, séquençage, métagénomique

- Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est de développer un outil microfluidique permettant de capter et de séparer les constituants d'échantillons de glace (débris cellulaires, bactéries et ADN) en vue de l'analyse métagénomique des communautés microbiennes piégées dans les archives glaciaires. Les bactéries extraites seront ensuite lysées à l'intérieur du microsystème, afin de récupérer leur ADN pour le séquencer.

Cet outil pourra être couplé à des modules de mesures chimiques existants dédiés à l'analyse en continu d'échantillons issus de la fonte d'une carotte de glace.

- Verrous scientifiques

Etant donnée la difficulté d'obtenir des échantillons de glace (ex. projet EPICA, durée de 10 ans, 3200 m de glace, 800 000 ans d'archive, 20 millions d'euro) il est essentiel d'améliorer les outils de captage et d'échantillonnage de microorganismes si l'on veut accéder aux archives anciennes (quantité très limitée de glace). Jusqu'à présent, l'échantillonnage de cellules microbiennes se fait de façon « brute », c'est-à-dire à partir de grands volumes de glace qui sont fondus et ensuite filtrés pour en extraire les organismes. Or, cette méthode possède plusieurs inconvénients : une perte de résolution temporelle (fondre et filtrer des grands volumes de glace mélange les couches des archives et plusieurs milliers d'années peuvent être intégrées dans un même échantillon), une perte d'échantillon (en raison des protocoles de décontamination de la glace) et des risques accrus de contamination (beaucoup d'étapes de manipulation). Si l'on veut coupler les données microbiologiques aux données physiques et chimiques, il faut descendre en échelle et extraire les microorganismes en continu.

- Contributions originales attendues

La solution proposée consiste à développer un microsystème hybride intégrant plusieurs modules de tri (par acoustophorèse et diélectrophorèse notamment) afin de séparer les constituants de la glace fondue. Un module dédié à la lyse des bactéries par champ électrique sera également intégré. Peu d'exemples de laboratoires sur puce intégrant différents champs de force pour le traitement complet d'un échantillon ont été rapportés à ce jour dans la littérature. L'emploi de microsystèmes pour ce type d'applications est également inédit et devrait permettre aux microbiologistes d'exploiter au mieux un matériel biologique rare.

Pour faciliter l'intégration du module de lyse à la puce microfluidique, l'emploi de matériaux de type polymères dopés avec des fibres de carbone sera envisagé. Ceci permettra l'acquisition de nouvelles connaissances autour de ces matériaux innovants en plein essor.

- Programme de recherche et démarche scientifique proposée

0 - 6 mois	:	Revue de littérature, formation aux techniques de microfabrication.
6 - 12 mois	:	Conception, fabrication et test du module de tri par acoustophorèse qui permettra d'extraire les débris cellulaires ou autres grosses particules présentes dans l'échantillon. Tests avec des billes de différentes tailles ainsi qu'avec des échantillons biologiques contenant des microorganismes présents à une concentration connue.

- 12 - 24 mois Développement du module de tri par diélectrophorèse permettant de séparer les bactéries des constituants plus petits (ADN, virus...). Assemblage des deux modules et test sur carottes de glace synthétisées au laboratoire.
- 24 -28 mois : Intégration du module de lyse des bactéries.
- 28–36 mois : Rédaction articles et thèse.

○ Encadrement scientifique :

Directrice de thèse : Catherine Larose (33%)

Co-encadrants : Julien Marchalot (33 %), Marie Frénéa-Robin (33 %),

Catherine Larose est chargée de la définition du cahier des charges et des éventuelles évolutions des spécifications. Elle assurera l'encadrement du doctorant sur les aspects microbiologie (choix des bactéries modèles, fabrication des carottes de glace, etc.)

Julien Marchalot et Marie Frénéa-Robin encadreront le (la) candidat(e) sur les parties conception et réalisation du dispositif microfluidique (formation à la simulation multiphysique ainsi qu'aux techniques de microfabrication et de caractérisation).

L'étudiant passera au moins 90% de son temps au laboratoire Ampère. Les 10% restant seront partagés entre la plateforme NanoLyon de l'INL et le laboratoire de glaciologie de Grenoble qui fait partie de l'IGE (Institut des Géosciences de l'Environnement).

○ Financement de la thèse (origine, employeur, montant, durée du financement, etc.)

Bourse du ministère (contrat doctoral ECL, durée 3 ans)

○ Profil du candidat recherché (prérequis)

Le (la) candidat(e) sera de préférence un(e) étudiant(e) physicien(ne) ou mécanicien(ne) intéressé(e) par le développement instrumental et l'interdisciplinarité. Le (la) candidat(e) aura de préférence un master dans le domaine des micro et nanotechnologies, de la microfluidique ou des matériaux. Une première expérience de travail à l'interface physique/biologie constituerait un plus. Il (elle) devra être capable de s'intégrer dans des équipes de différentes cultures, avoir un goût marqué pour l'expérimentation, être autonome et savoir prendre des initiatives, rédiger et présenter de présenter ses travaux de manière claire et synthétique, tant à l'écrit qu'à l'oral.

○ Compétences qui seront développées au cours du doctorat

A l'issue de sa formation, le (la) doctorante aura développé des compétences dans le domaine de l'ingénierie pour la biologie et de la conception de systèmes multiphysiques. Il (elle) sera intégré(e) à un laboratoire pluridisciplinaire et disposera d'un environnement de travail unique pour se former à différentes techniques (microfabrication, simulations numériques, culture de bactéries, manipulation d'échantillons de glace...). Il/elle sera également amené(e)

à développer ses compétences en communication en présentant régulièrement ses travaux lors de réunions ou conférences.

- Perspectives professionnelles après le doctorat

De par ses expériences acquises dans des domaines scientifiques exigeants et transdisciplinaires (microbiologie, glaciologie, microtechnologies, microfluidique) et grâce à la possibilité d'enseigner à l'ECL, le ou la candidat(e) pourra tout à fait s'engager dans une carrière académique. Par ailleurs le sujet de thèse présentant de nombreux aspects applicatifs comme le développement technologique, il (elle) pourra aussi s'orienter vers des emplois en R&D dans l'industrie dans le domaine en plein essor des micro et nano technologies.

- Références bibliographiques sur le sujet de thèse

[1] S. Toru, M. Frénéa-Robin, N. Haddour, and F. Buret. 'Tunable and label-free bacteria alignment using standing surface acoustic waves'. 34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'12), San Diego, USA, Aug. 28-Sept. 1, 2012, pp. 319-322.

[2] S. Toru, F. Buret, and M. Frénéa-Robin. 'Towards optimized conception of SSAW- based acoustic tweezers'. IEEE NEMS conference, Hawaiï, USA, Apr. 13-16, 2014.

[3] X. Ding, S.-C. S. Lin, B. Kiraly, H. Yue, S. Li, I.-K. Chiang, J. Shi, S. J. Ben-kovic, and T. J. Huang, "On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 109, no. 28, pp. 11105–11109, 2012.

[4] T. Laurell, F. Petersson, and A. Nilsson, "Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles," Chem. Soc. Rev., vol. 36, no. 3, pp. 492–506, 2007.

[5] M. Frénéa, S. Faure, B. Le Pioufle, P. Coquet, and H. Fujita, 2003. 'Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis'. Materials Science and Engineering : C, 23(5) :pp. 597–603.

[6] Marchalot J, Chateaux J-F, Faivre M, Mertani HC, Ferrigno R, Deman A-L. Dielectrophoretic capture of low abundance cell population using thick electrodes. Biomicrofluidics. 2015;9(5):054104.

[7] S. Menad, A. El-Gaddar, N. Haddour, S. Toru, M. Brun, F. Buret, and M. Frénéa- Robin, 2014. 'From Bipolar to Quadrupolar Electrode Structures : An Application of Bond-Detach Lithography for Dielectrophoretic Particle Assembly.' Langmuir, 30(19) :pp. 5686–5693.

[8] S. Menad, L. Franqueville, N. Haddour, F. Buret, and M. Frénéa-Robin, 2015. 'nDEP-driven cell patterning and bottom-up construction of cell aggregates using a new bioelectronic chip'. Acta Biomaterialia, 17 :pp. 107–114.

[9] S.H. Meglič, Pulsed Electric Fields-Assisted Extraction of Molecules from Bacterial and Yeast Cells - Handbook of Electroporation, in: D. Miklavcic (Ed.), Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 1–19.

[10] Branch, Darren W.; Vreeland, Erika C.; McClain, Jamie L.; Murton, Jaclyn K.; James, Conrad D.; Achyuthan, Komandoor E. Rapid Nucleic Acid Extraction and Purification Using a Miniature Ultrasonic Technique. Micromachines . Jul2017, Vol. 8 Issue 7, p1-17. 17p.