

Proposition de stage Master 2

Laboratoire d'accueil : LISBP – INSA Toulouse-
Plateforme GeT-Biopuces en collaboration avec la plateforme MétaToul

Encadrants: Marie Ange Teste (teste@insa-toulouse.fr), Floriant Bellvert (bellvert@insa-toulouse.fr)

Mise au point d'une méthode d'extraction unique permettant des analyses combinées de transcriptomique et métabolomique

Le métabolisme d'un système biologique est soumis à de nombreuses régulations permettant d'assurer son bon fonctionnement ainsi que son adaptation aux modifications environnementales. En biologie de synthèse les capacités métaboliques de la bactérie *Escherichia coli* sont étudiées et exploitées dans le cadre de la production de métabolites d'intérêts. L'étude de la régulation du métabolisme d'*E.coli* est donc primordiale pour comprendre et appréhender au mieux son fonctionnement. Cette régulation est mise en œuvre à différents niveaux cellulaires, transcriptionnel, post traductionnel mais aussi directement au niveau métabolique.

Les approches « omiques » sont par conséquent des outils indispensables pour identifier et quantifier ces différents composants cellulaires (ARNm, protéines, métabolites). Néanmoins les études de chacun de ces grands ensembles, transcriptome, protéome, métabolome du fait de leur nature physico chimique différente sont étroitement liés à des contraintes expérimentales spécifiques (stabilité, polarité, quantité, intégrité) ne permettant pas à ce jour leur analyse simultanée sur un même échantillon. Pour l'instant aucun protocole permettant une extraction commune transcriptome et métabolome n'est disponible. La majorité des analyses couplant la métabolomique et la transcriptomique se font sur des échantillons différents. Ce type de prélèvement engendre des biais expérimentaux tels qu'une différence de temps de prélèvement entre les différents échantillons ou une hétérogénéité au sein d'une population, compliquant ainsi l'intégration des différents jeux de données omics.

L'objectif de ce projet sera de mettre au point un mode opératoire permettant, à partir d'un échantillon unique, de réaliser une étude transcriptomique et une étude métabolomique. Le mode opératoire devra intégrer l'ensemble des contraintes inhérentes à chaque approche, et notamment assurer un quenching rapide du métabolisme (étape cruciale consistant à figer le contenu métabolique afin d'avoir une image la plus proche du réel) et des modes d'extractions garantissant l'intégrité et une quantité suffisante des ARNs et des métabolites.

Dans un premier temps ces approches seront développées sur une culture d'*E coli* à l'état stationnaire métabolique (non limitant en biomasse) et nous évaluerons plusieurs techniques d'échantillonnage et de traitement des cultures pour l'analyse parallèle du transcriptome et du métabolome. L'évaluation sera faite sur une quantité de cellules standard en comparant :

- d'une part la quantité et l'intégrité des ARNs (nanodrop, bioanalyseur) et leur expression (qPCR) et

-d'autre part l'analyse qualitative et quantitative des métabolites centraux (chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution) aux résultats obtenus avec les méthodologies classiques pour chaque technique.

Une fois le mode opératoire validé, des tests seront faits afin d'évaluer et optimiser la quantité minimum d'échantillon nécessaire pour la double analyse, et ainsi pouvoir proposer ce mode opératoire dans un contexte de fréquences d'échantillonnages rapides. Ce développement constituera un outil indispensable pour appréhender entre autre des questions autour des régulations rapides du métabolisme comme l'étude des flux glyoxyliques.