

Sujet de thèse :

Imagerie métabolomique par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Application à l'analyse métabolomique de tissus différenciés de larves et polypes coralliens.

Encadrement

Laboratoire d'accueil

Équipe BIM – Biochimie des interactions microbiennes, UMR 7245 – MCAM, MNHN/CNRS.

Muséum national d'Histoire naturelle, 63 rue Buffon 75005 Paris

Direction de thèse

Pr Alain PARIS (alain.paris@mnhn.fr) & Dr Isabelle DOMART-COULON (isabelle.domart-coulon@mnhn.fr)

Modèle biologique étudié

Corail scléactiniaire (espèce *Pocillopora acuta* Lamarck 1816, élevée en aquarium) pris à ses stades précoces de développement (larve et polype primaire)

Descriptif du sujet de thèse et des méthodes envisagées

Contexte scientifique et objectif général :

La métabolomique désigne l'ensemble des techniques de spectrométrie destinées au phénotypage métabolique des organismes qui sont nécessairement combinées aux analyses statistiques multivariées des données. Une transposition à l'analyse de coupes de tissus se fait par une analyse en spectrométrie de masse (MS) des analytes par MALDI-ToF. En imagerie MS (IMS), le bruit de fond reste élevé pour les ions d'analytes de rapports masse/charge (m/z) inférieurs à 500 ; il s'explique par l'emploi de matrices organiques nécessaires à l'ionisation des analytes.

L'analyse métabolomique des données IMS qui implique une analyse multivariée se heurte à :

- la très grande taille des fichiers de données brutes (> 1 Go), d'où la difficulté pratique de mise en œuvre des outils d'analyse statistique multivariée,
- la détection d'un bruit de fond important rendant délicate la détection des métabolites endogènes.

La réduction du bruit de fond peut se faire en remplaçant le dépôt en spray de matrices organiques sur les coupes par la technique NIMS (Nanostructured Initiator Mass Spectrometry). Les supports NIMS ne sont pas disponibles commercialement mais sont produits par des plateformes dédiées.

Pour accéder à l'IMS métabolomique vraie, la taille des données IMS sera réduite en diminuant la redondance des données acquises selon un transect différenciant les unes des autres des zones délimitées par la fluorescence des tissus mesurée en parallèle (acquisition supervisée).

L'objectif est donc d'obtenir *in fine*, grâce à des analyses statistiques multivariées, un réseau métabolique différentiel qui résume la spécificité métabolique effective des zones tissulaires définies sur le transect.

Le modèle corail *Pocillopora acuta*, dont la métamorphose de la larve en polype primaire constitue une étape cruciale du cycle de vie, sera utilisé pour valider la procédure analytique et l'algorithme de retraitement. Différents paramètres influençant la métamorphose des larves pourront alors être étudiés par IMS métabolomique. L'identification des biomarqueurs métaboliques putatifs se fera sur instrumentation à haute résolution (LC-Q-ToF-MS, FT-ICR-MS) sur des extraits bruts de tissus microdisséqués.

Objectifs détaillés :

L'approche NIMS utilise une désorption/ionisation par laser activant une surface nanostructurée de silice modifiée par des composés fluorés (siloxanes), qui permet la détection sensible des petites molécules en l'absence de matrice organique et, ainsi, l'acquisition du métabolome sur coupe de tissu. Pour produire les supports NIMS, la gravure ionique réactive sera mise en œuvre dans le laboratoire du Dr Yong Chen (ENS, Paris), spécialiste de microfluidique et de traitement des surfaces de silicium. Différentes conditions de préparation des supports NIMS seront étudiées (temps de gravure, intensité, température, etc.) pour obtenir une surface nanostructurée dense pour des mesures sensibles sur support NIMS.

L'acquisition des données IMS sera réalisée à l'ICSN (CNRS, Gif-sur-Yvette) en collaboration avec le Dr David Touboul sur un spectromètre MALDI ToF/ToF UltrafleXtreme (Bruker).

L'algorithme de retraitement des données sera développé au Muséum. Le transect d'acquisition défini à partir d'une image optique (transmission, fluorescence) d'une coupe similaire (série) permettra de limiter la taille des données IMS.

Les analyses statistiques multivariées (PCA, ICA, ICDA, etc.) seront réalisées pour caractériser le métabolome spécifique de chaque zone imagée. L'image métabolomique globale apparaîtra sous forme d'un ensemble de sous-réseaux métaboliques représentatifs des différentes zones étudiées.

La validation structurale des biomarqueurs sélectionnés sera réalisée par LC-ToF-MS (MCAM, MNHN, Dr A. Marie) ou par FT-ICR-MS (IPCM, Sorbonne Université, Dr S. Alves) sur extraits bruts ou après microdissection des types tissulaires étudiés.

Le modèle biologique utilisé pour valider l'IMS métabolomique par NIMS est une espèce corallienne pionnière sur les récifs et dont le recrutement larvaire a un fort enjeu écologique (*Pocillopora acuta*). Les métabolites impliqués dans le recrutement larvaire pourront ainsi être révélés. Des précurseurs marqués au ^{13}C ou ^{15}N seront utilisés. La démarche analytique utilisée en IMS métabolomique devra pouvoir révéler par déconvolution statistique les différents stades physiologiques qui se succèdent entre les stades larvaire et polype primaire. Des expérimentations sur dispositif microfluidique seront effectuées.

Compétences scientifiques et qualités requises

Le(la) candidat(e) devra avoir des compétences solides en chimie analytique (MS), en particulier pour ce qui est en lien avec la métabolomique, en statistique multivariée (environnement R) et en informatique (Linux). Les connaissances en biologie sont appréciées mais pas indispensables.

Le(la) candidat(e) devra faire preuve de sa capacité à travailler en équipe, être réactif et dynamique et à être mobile. Il(Elle) devra faire preuve d'autonomie et de rigueur scientifique. La maîtrise de l'anglais est indispensable.

Financement

Le projet MetaboNIMS est financé sur trois ans par le DIM (Domaine d'Intérêt Majeur) ELICIT en région Ile de France.

Modalités de candidature

Etre titulaire d'un master et/ou d'un diplôme d'ingénieur

Date limite de candidature : 15 octobre 2019

Pièces à fournir à Alain Paris (alain.paris@mnhn.fr) et à Isabelle Domart-Coulon (isabelle.domart-coulon@mnhn.fr) :

- cv et lettre de motivation
- deux lettres de recommandation
- attestation de classement au master ou en sortie de formation d'ingénieur