

2nd year Master in Biotechnology Cell and Molecular Biology 2020-2021

Host laboratory/Laboratoire	INEM UMR 7355 CNRS Orléans CBM UPR4301 CNRS Orléans
Supervisor/Responsables Arnaud Menuet (INEM) Marylène Bertrand (CBM)	menuet@cns-orleans.fr marylene.bertrand@cns-orleans.fr

Les déficits sensoriels dans le syndrome de l'X fragile : une perturbation métabolique inattendue des cellules gliales révélée par analyse RMN

Ce projet repose sur la collaboration de deux équipes de recherche aux compétences complémentaires : l'équipe « Neurogénétique » (INEM) pour son expertise dans le domaine de la **modélisation animale de pathologies du neurodéveloppement** et l'équipe « RMN des biomolécules » (CBM) pour ses compétences dans **les approches métaboliques, notamment par analyse RMN**.

Ce projet concerne le syndrome du X-fragile (FXS), forme la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire. Outre l'atteinte intellectuelle, des déficits comportementaux peuvent être associés, incluant une hyperactivité, des perturbations émotionnelles ainsi que des troubles du spectre autistique. De plus, chez plus de 60 % des patients des symptômes d'automutilation sont également présents soulignant la présence de déficits sensoriels. Cependant, ces derniers sont aujourd'hui peu explorés bien qu'ils soient susceptibles de contribuer de façon significative aux divers troubles comportementaux.

Le FXS est une pathologie monogénique du neurodéveloppement causée par une mutation du gène *FMR1* conduisant à la perte d'expression de la protéine codée FMRP. Cette protéine est un régulateur traductionnel d'ARNm exprimé au sein du système nerveux central. En son absence, des défauts de la fonction synaptique et de formation des épines dendritiques ont été décrits. A ce jour, si les fonctions neuronales de FMRP sont de mieux en mieux comprises, son implication dans la sensorialité reste méconnue. Pour aborder cet aspect, ce projet repose sur l'utilisation des souris invalidées pour le gène *Fmr1*, **les souris *Fmr1* KO**, modèle du FXS. Afin d'explorer plus précisément la sphère sensorielle, l'équipe « Neurogénétique » évalue la sensibilité tactile de ces animaux dans des conditions d'inflammation plantaire (Thèse Vidian de Concini 2018/2021). Après l'injection de l'adjuvant complet de Freund dans un coussinet, les souris *Fmr1* KO ont montré dès les premiers jours, une hypersensibilité tactile en réponse à cette inflammation chronique. Afin d'explorer les causes de cette perturbation sensorielle, des expériences de PCR quantitatives ont été menées à partir de prélèvements de la corne dorsale de la moelle épinière. Les résultats obtenus ont montré des défauts d'expression de marqueurs géniques chez les souris *Fmr1* KO révélant **une perturbation de l'activité des cellules gliales tant dans leurs réponses inflammatoires que dans leurs fonctions métaboliques**. Face à ces données, il est apparu nécessaire d'utiliser une approche permettant de décrire avec précision les changements métaboliques occasionnés localement par la réactivité gliale. Pour cet aspect, une collaboration a été initiée avec l'équipe « RMN des biomolécules » afin d'évaluer par RMN la variation de métabolites liés aux génotypes et aux conditions inflammatoires. **Les analyses multivariées (PCA, PLS-DA et OPLS-DA) obtenues à partir de spectres RMN de souris *Fmr1* KO et sauvages ont révélé un profil spécifique chez les animaux mutés en condition d'inflammation chronique**. Face

à ces données obtenues *in vivo*, une modélisation *in vitro* réalisée à partir de cellules gliales en culture, particulièrement les astrocytes, a été mise en place. Dans ces conditions expérimentales, l'équipe « Neurogénétique » a récemment montré que les dysfonctionnements des cellules gliales suggérées *in vivo* sont également présents en culture. Ces résultats suggèrent des défauts spécifiques de ces cellules non-neuronales qui jusqu'à lors étaient peu étudiées dans le FXS.

Face à la nécessité d'étudier plus en détail l'implication des cellules gliales dans le FXS, l'objet de ce projet de stage de master 2 sera, en premier lieu, de poursuivre l'identification des molécules et métabolites obtenus par analyse RMN et d'en évaluer les variations quantitatives selon les conditions expérimentales menées *in vivo*. Ce même type d'analyse sera également mené sur les milieux des cultures stimulées et les extraits cellulaires. Ce projet mettant en avant l'implication de cellules non neuronales dans le FXS permettra de mieux cerner la physiopathologie du FXS. De plus, les désordres métaboliques qui seront identifiés offriront de nouvelles pistes d'identification de biomarqueurs indispensables au diagnostic et au suivi thérapeutique.

La/le stagiaire interviendra dans les deux laboratoires, à l'INEM pour les analyses *in vivo* / *in vitro* et au CBM pour les analyses par spectrométrie RMN.

Planning d'activités et Méthodologies :

- **A l'INEM**, encadré par Arnaud Menuet et en binôme avec Vidian de Concini (doctorant) :
 - Culture de cellules gliales, en particulier les astrocytes
 - Analyse de l'expression génique par PCR quantitative
 - Mesure de la réponse inflammatoire *in vivo* et *in vitro* (par méthode Elisa et multiplex)
- **Au CBM**, encadré par Marylène Bertrand :
 - Mise au point du protocole expérimental pour l'extraction des métabolites et préparation des échantillons.
 - Analyse des échantillons par RMN 1D.
 - Traitement des spectres et analyse statistique des données recueillies (analyse de données multivariées : PCA, PLS-DA, OPLS-DA).
 - Identification des métabolites et interprétation.

L'ensemble de ce travail complétera l'article commun actuellement en cours de préparation (De Concini et al.) et fera l'objet de demandes en vue de l'obtention d'un financement de thèse.

Principales publications:

- Bertrand, M.**, M. Decoville, H. Meudal, S. Birman and C. Landon (2020). "Metabolomic NMR studies at presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease on a Drosophila model." J Proteome Res.
- Blasco, H., C. Veyrat-Durebex, **M. Bertrand**, F. Patin, F. Labarthe, H. Henique, P. Emond, C. R. Andres, C. Antar, C. Landon, L. Nadal-Desbarats and F. Maillot (2017). "A Multiplatform Metabolomics Approach to Characterize Plasma Levels of Phenylalanine and Tyrosine in Phenylketonuria." JIMD Rep 32: 69-79.
- Felgerolle, C., B. Hebert, M. Ardourel, G. Meyer-Dilhet, **A. Menuet**, K. Pinto-Morais, J. C. Bizot, J. Pichon, S. Briault and O. Perche (2019). "Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome." Front Behav Neurosci 13: 228.
- Reverchon, F., V. de Concini, V. Larrigaldie, S. Benmerzoug, S. Briault, D. Togbe, B. Ryffel, V. F. J. Quesniaux and **A. Menuet** (2020). "Hippocampal interleukin-33 mediates neuroinflammation-induced cognitive impairments." J Neuroinflammation 17(1): 268.
- Reverchon, F., S. Mortaud, M. Sivoyon, I. Maillot, A. Laugeray, J. Palomo, C. Montecot, A. Herzine, S. Meme, W. Meme, F. Erard, B. Ryffel, **A. Menuet** and V. F. J. Quesniaux (2017). "IL-33 receptor ST2 regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria." PLoS Pathog 13(4): e1006322.