

Nom et prénom du proposant	Gloire Mélanie
Numéro de référence SEMAPHORE	26325085
Référence de la demande	5201616F
Titre du projet	Influence réciproque entre l'expression de l'APP et le métabolisme du glucose au niveau de l'hippocampe

Rapport d'activités sur la 2ème bourse FRIA -1ère année

1. Résumé du travail

L'hypothèse de mon projet de thèse est que l'APP et le métabolisme du glucose cérébral s'influencent réciproquement. Cette hypothèse se base sur le lien évident entre le métabolisme du glucose et la maladie d'Alzheimer. De plus, puisque les études s'efforçant de soigner la maladie à travers des stratégies ciblant le peptide amyloïde ont échoué à ce jour, il m'a paru intéressant d'investiguer plus profondément le rôle du précurseur de ce peptide : l'APP. Même si les rôles de ce dernier sont élusifs et controversés, l'APP semble impliqué dans l'homéostasie du métabolisme. En effet, lors du vieillissement ou dans le cas de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la trisomie 21, la résistance à l'insuline..., la disponibilité en glucose dans le cerveau est réduite, aboutissant à une augmentation compensatoire de l'expression de l'APP. Cette augmentation compensatoire semble être le point de rupture dans l'homéostasie du métabolisme cérébral ainsi que des neurotransmetteurs et donc de l'apparition des déficits cognitifs retrouvés dans les pathologies décrites précédemment. Le but de ce projet de thèse est donc d'étudier l'impact de la relation entre le niveau d'expression de l'APP et le glucose cérébral sur les activités synaptique et métabolique de l'hippocampe. Les animaux utilisés dans le cadre du projet sont des souris APP WT, HT et KO (mâles et femelles) âgées de 6 mois.

2. Résultats obtenus

1. Rôle de l'APP dans l'homéostasie du métabolisme énergétique et des neurotransmetteurs de l'hippocampe (basal et en hypoglycémie)

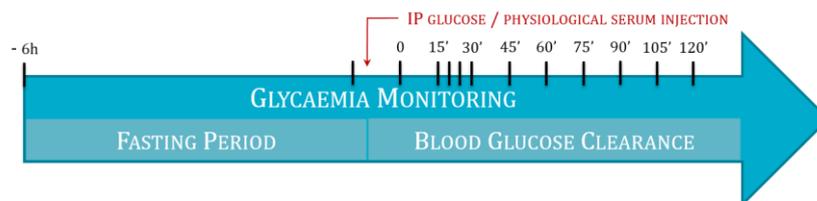
Les métabolites aqueux de l'hippocampe de souris WT, HT et KO ont été extraits (extraction méthanol/chloroforme), resuspendus dans du tampon phosphate (100% de deutérium) et analysés par RMN du proton (spectromètre de 500MHz). D'après les résultats obtenus, **l'APP joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des métabolites énergétiques et des neurotransmetteurs de l'hippocampe** (voir figures 1 et 2). En effet, l'abondance du glutamate est augmentée chez les souris KO alors que celle du GABA est diminuée. Ces modifications sont cohérentes avec l'hyperexcitabilité des souris APP KO décrite dans la littérature. L'excès de glutamate pourrait être converti en glutamine puisque cette dernière est également plus abondante chez les souris KO. Ensuite, le métabolisme cholinergique semble également dépendre du niveau d'expression d'APP puisque les souris KO présentent moins de choline et phosphocholine mais plus de leur précurseur : la

glycérophosphocholine (résultat non montré). Cette piste semble prometteuse puisque le métabolisme cholinergique est connu pour être dérégulé dans la maladie d'Alzheimer. De plus, le fait que l'APP joue un rôle dans la production d'ATP au niveau de la mitochondrie est également retrouvé dans nos observations. En effet, le ratio ADP/ATP et le niveau d'AMP dépendent de l'expression de l'APP. **L'hypothèse de départ supposant l'importance du niveau d'expression de l'APP dans la régulation de l'hippocampe semble se confirmer car chaque métabolite décrit précédemment varie de façon intermédiaire chez les souris HT.** La dernière chose à noter est que le métabolisme des souris KO se distingue fortement de celui des deux autres groupes alors que les souris HT et WT ne présentent pas de différences statistiques de taux des métabolites.

Cette analyse par RMN du proton des modifications métaboliques peut également être réalisée sur un métabolisme soumis à une hypoglycémie. En effet, grâce à l'application d'une pompe à insuline en sous-cutané, il est possible d'induire une hypoglycémie *in vivo* sur nos animaux. Par injection continue mais non constante d'insuline, la glycémie est diminuée de manière progressive et contrôlée à environ 50mg/dl (+/- 3mM de glucose sanguin). Lorsque la glycémie a été maintenue à cette valeur pendant 2h, l'animal est sacrifié. Les résultats de cette expérience ne sont pas encore disponibles du fait qu'il est difficile de stabiliser à 50mg/dl la glycémie des souris APP KO ; celles-ci mourant parfois en cours de l'expérimentation.

2. Rôle de l'APP dans la clearance du glucose sanguin par les cellules périphériques

Un test intrapéritonéal de tolérance au glucose a été pratiqué afin de déterminer si l'APP influence également le métabolisme du glucose périphérique. Pour ce faire, une concentration de 2mg/g de poids du corps de glucose (dilué dans 100µl de sérum physiologique) a été injectée dans le péritoine de l'animal à jeun depuis 6h. Le groupe contrôle a reçu un volume équivalent de sérum physiologique. Un dispositif de maintien permet de contenir l'animal dans des conditions non stressantes et la récolte du sang (glucomètre, contour Next, Bayer) par la veine caudale. Les valeurs de glycémie ont été enregistrées au moment de la mise à jeun, juste avant l'injection et pendant 2h après l'injection selon le pattern présenté sur la figure ci-dessous.



Le test, réalisé dans les conditions précédemment décrites, ne montre aucune différence d'absorption de la charge en glucose par les cellules périphériques des souris WT, HT, KO. De plus, la glycémie des animaux à jeun depuis 6h et non privés de nourriture n'est également pas différente.

3. Rôle de l'APP dans l'activité métabolique du glucose cérébral

Une collaboration avec les spécialistes en imagerie sur petit animal du CMMI de Gosselies s'est révélée intéressante pour mesurer l'activité métabolique du glucose dans les trois dimensions du cerveau chez nos souris APP WT, HT et KO. En effet, il est connu que la capture du glucose par les neurones mais également son taux basal dans le cerveau est modifié dans la maladie d'Alzheimer. Il est donc important de vérifier *in vivo* le flux de glucose dans le cerveau des souris dépourvues d'APP. La technique choisie a été le PET scan au FDG (Fluorodésoxyglucose) et les résultats des souris KO sont en cours d'analyse. Néanmoins, les résultats préliminaires (6 femelles WT et 6 femelles HT) démontrent que l'expérience est réalisable et qu'aucune différence significative d'activité du glucose dans les diverses zones cérébrales étudiées n'est présente entre ces deux génotypes. En effet, l'absence d'une des deux allèles ne modifie que peu le phénotype mais il est possible que les souris KO se distingueront des autres génotypes, comme déjà observé au cours de ma thèse.

3. Evolution des perspectives

Au cours de cette troisième année de thèse, de nombreuses pistes sur l'interaction réciproque entre l'APP et le métabolisme du glucose ont été investiguées. Néanmoins, l'analyse de certaines de ces expériences n'est pas achevée. Les prochaines étapes du projet visent donc à clôturer les expériences suivantes :

- La spectroscopie du proton des hippocampes soumis à une hypoglycémie *in vivo* (pour laquelle le groupe expérimental des souris KO est incomplet)
- Le PET-scan ainsi que l'autoradiographie des coupes tritiées (attente des analyses par le CMMI)

Ensuite, certaines expériences électrophysiologiques (en cours) viendront compléter celles détaillées dans le rapport rédigé pour l'octroi de la seconde bourse. Par exemple, le résultat obtenu lors de l'application de picrotoxine sur les tranches d'hippocampes sera investigué plus en profondeur (« mini-slice ») et les potentiels dus au passage du courant à travers les récepteurs NMDA seront analysés par application de CNQX. Le catabolisme du glucose neuronal et astrocytaire sera observé par RMN du carbone 13.

Enfin, le volet *in vitro* utilisant des cultures primaires corticales sera important car il viendra répondre à l'hypothèse de base qui est que la diminution du métabolisme du glucose viendrait augmenter l'expression de l'APP.

4. Figures

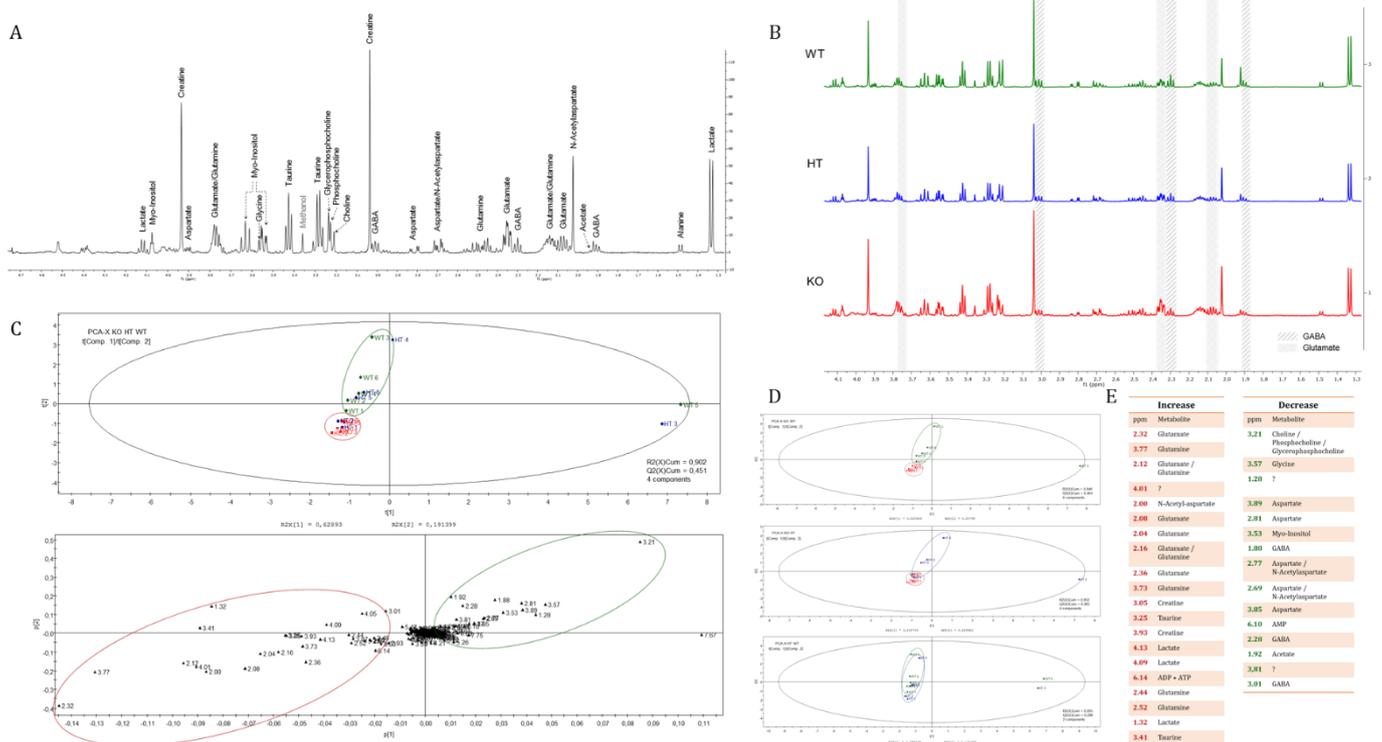


Figure 1. Variation dans l'abondance des métabolites aqueux de l'hippocampe des souris APP WT, HT ou KO. A) Détermination des métabolites aqueux correspondant aux pics observés (de 1.3 à 4.7 ppm) sur un spectre représentatif de la population des souris APP KO obtenu par RMN du proton (500MHz) au départ d'extraits d'hippocampes. B) Variation des aires sous la courbe pour les déplacements chimiques correspondant au GABA et au glutamate pour les trois génotypes. C) « Loadings plot » et « score plot » de la PCA-X (analyse en composantes principales) (PC1 et PC2) réalisée à partir des spectres des trois génotypes. La valeur de Q2 (> 0.4) indique que le modèle est valide. D) « Score plots » des PCA-X réalisées pour comparer les variations entre deux génotypes et illustrant une faible disparité entre les hippocampes HT et WT. E) Liste des métabolites dont l'aire sous la courbe est modifiée dans les génotypes.

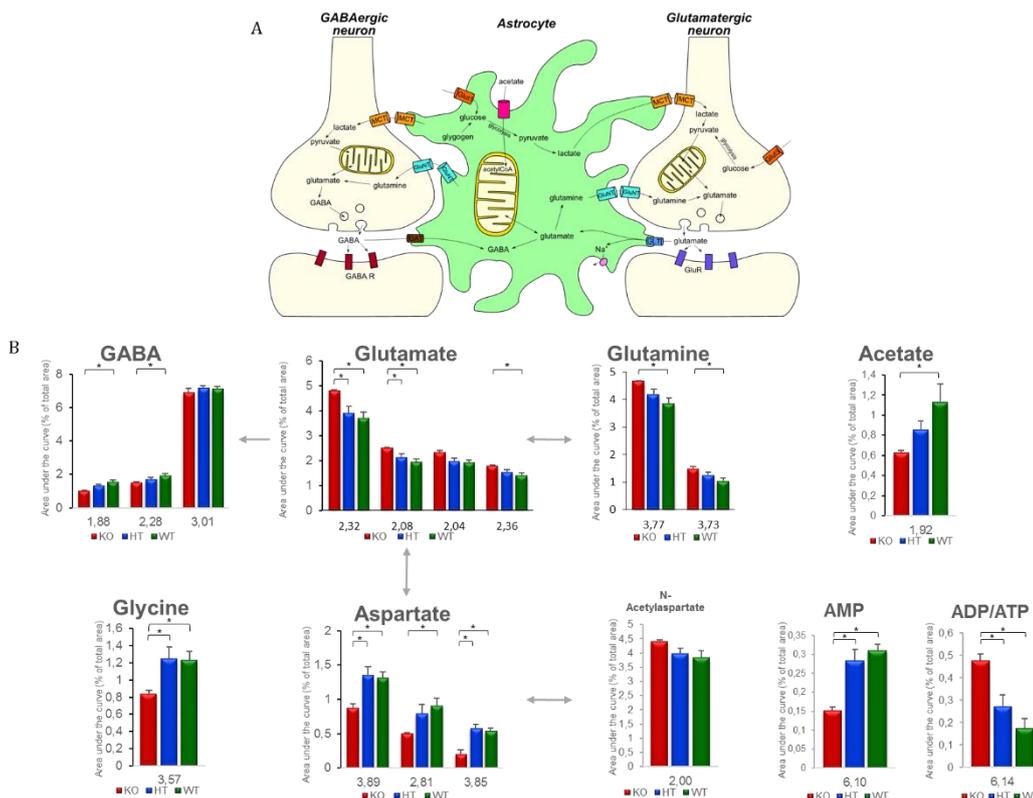


Figure 2. Modifications du métabolisme énergétique et de l'homéostasie des neurotransmetteurs en fonction du niveau d'expression de l'APP. A) Métabolisme énergétique et homéostasie des neurotransmetteurs dans le système nerveux central. B) Quantification de l'aire sous la courbe pour les divers déplacements chimiques correspondant aux métabolites énergétiques dont l'abondance varie de manière significative en fonction du génotype.

6. Publications de Gloire Mélanie

2016

- Gloire Mélanie, Colet Jean-Marie, Villers Agnès, Ris Laurence, "Reciprocal influence between APP expression and glucose metabolism in the hippocampus" in "10th FENS Forum of Neuroscience", Copenhagen, Denmark (2016)

2015

- Gloire Mélanie, "Comité d'accompagnement - Réunion 2ème année", Divers/Autre (2015)
- Gloire Mélanie, "Rapport d'activités sur la 1ère Bourse FRIA et projet pour la 2ème bourse FRIA (2015)", soutenu le 2015-09-01, Travail avec promoteur/Doctorat (2015)
- Gloire Mélanie, Villers Agnès, Ris Laurence, "Relationship linking glucose metabolism to Amyloid Precursor Protein expression and processing" in "The 2015 Alzheimer's disease congress", London, UK, Colloque/Abstract (2015)
- Gloire Mélanie, Villers Agnès, Ris Laurence, "Study of the physiopathological roles of APP: implication in Alzheimer's disease and type 2 diabetes" in "11th National Congress of the Belgian Society for Neuroscience", Mons, Belgique, Colloque/Abstract (2015)

2014

- Pierrot Nathalie, Doshina Anna, Stancu Ilie-Cosmin, Ris Laurence, Gloire Mélanie, Lhommel Renaud, Quenon Lisa, Hanseeuw Bernard, Mutemberezi Valentin, Schakman Olivier, Gailly Philippe, Sindic Christian, Morel Nicole, Muccioli Giulio G, Maloteaux Jean-Marie, Kielen-Campard Pascal, Ivanoiu Adrian, Dewachter Ilse, Octave Jean-Noel, "LXR/RXR nuclear receptors agonists improve synaptic plasticity by induction of HMG-CoA reductase-mediated biosynthesis of cholesterol" in Nature Communications (2014) (soumise)
- Gloire Mélanie, "Comité d'accompagnement - Réunion 1ère année", Divers/Autre (2014)
- Gloire Mélanie, "Rapport d'activités pour la prolongation de la 1re bourse- FRIA 2014", soutenu le 2014-08-30, Travail avec promoteur/Doctorat (2014)