

LE RÔLE AMBIVALENT DE LA PROTÉINE PRÉCURSEUR DU PEPTIDE B-AMYLOÏDE (APP) DANS LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DU GLUCOSE

Le 16 septembre 2014

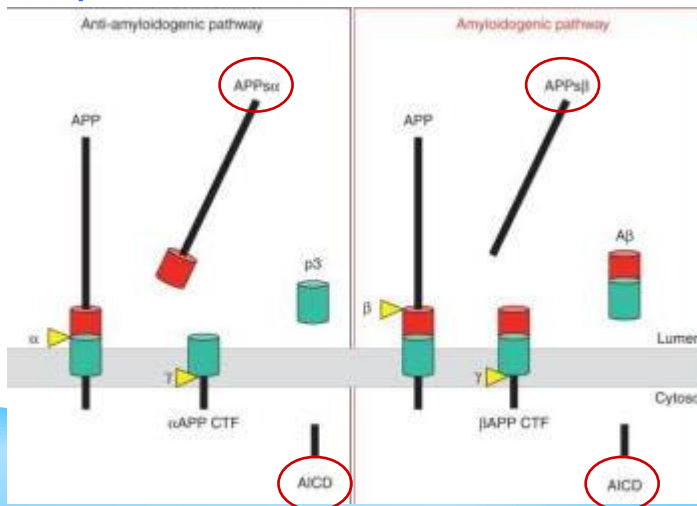
Mélanie GLOIRE

Promoteur : Prof. Laurence RIS

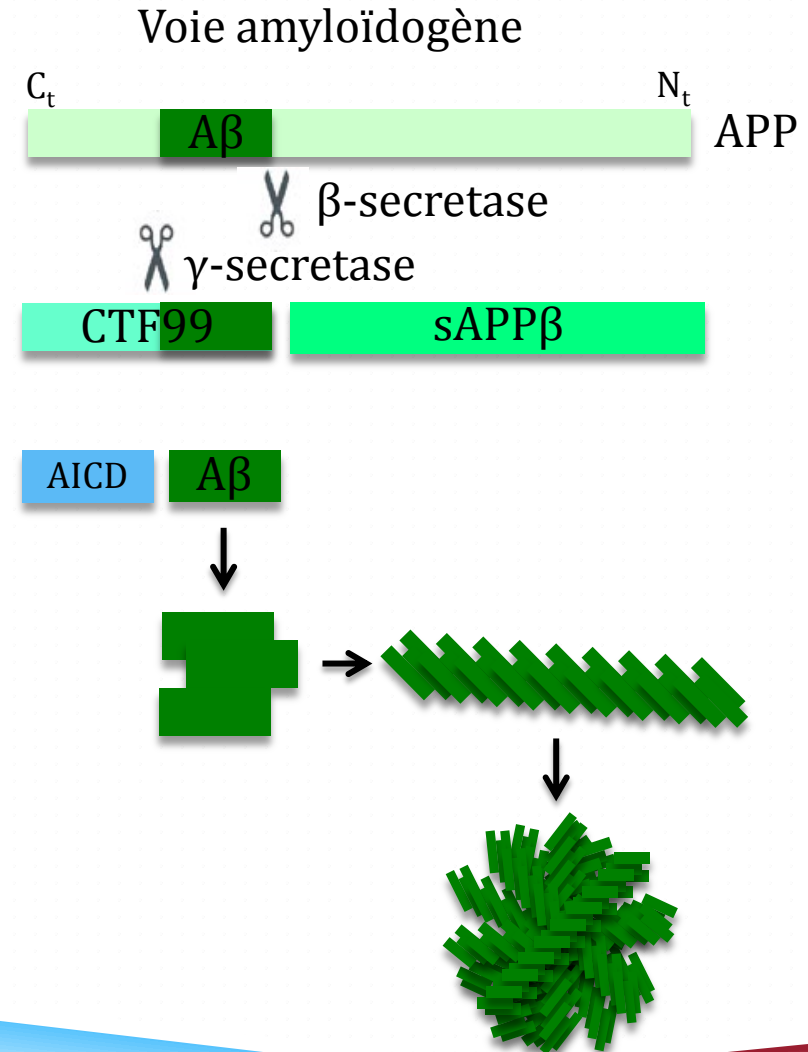
Service des Neurosciences

LA MALADIE D'ALZHEIMER

- APP → ↑ Aβ 42
- Hypothèse amyloïdogène
- Hypothèse novatrice : *APP per se* et ses dérivés protéolytiques seraient autant impliqués dans la pathologie que Aβ



➔ Rôles métaboliques et synaptiques



UNE MALADIE MÉTABOLIQUE ?

- Hypométabolisme du glucose → Hypométabolisme général
- Diabète de type III : Résistance à l'insuline

Hypométabolisme cérébral du glucose ↔ APP ?

Métabolisme physiologique → [APP] → +

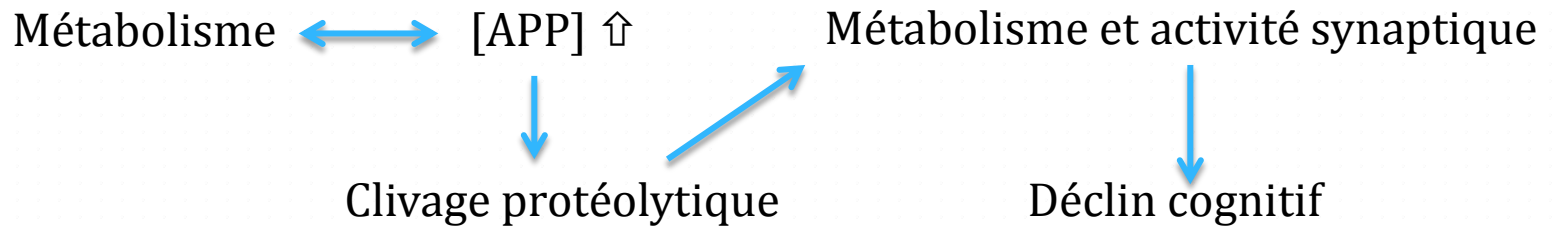
Hypométabolisme du glucose → [APP] ↑ → -

Syndrome
de Down

Modèles murins de
surexpression de
l'hAPP

HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET

Maladie d'Alzheimer = maladie métabolique



→ Lien entre la [APP], l'activité métabolique et synaptique d'un réseau neuronal



MÉTHODOLOGIE

[APP]

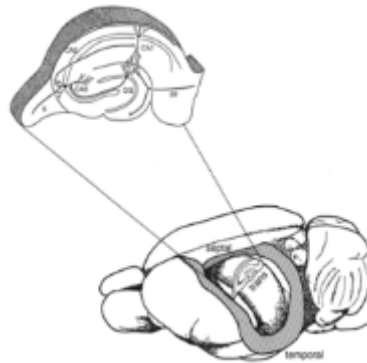


Métabolisme du glucose



Ex vivo → Tranche aigue d'hippocampe

| +/- X +/- | |
|-----------|-----|
| Génotype | APP |
| +/+ | 1 |
| +/- | 1/2 |
| -/- | 0 |



| Génotype | [Glucose] | Temps d'incubation | Âge |
|------------|-----------------------------|--------------------|------------|
| +/+ | 10mM - hypoglycémie | 1h30 | 6 semaines |
| +/- | 5mM - hypoglycémie douce | 5h30 | 6 mois |
| -/- | 2.5mM - hypoglycémie sévère | | |

→ Oligomé

MÉTHODOLOGIE



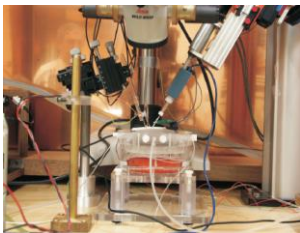
RMN ¹H

| | Epissage alternatif | F | R |
|--|---------------------|-----|-----|
| APP : 18 exons → Epissage alternatif → Isoformes | | | |
| APP ₇₇₀ | / | 6-7 | 8-9 |
| APP ₇₅₁ | 8 | 6-7 | 7-9 |
| APP ₆₉₅ | 7 et 8 | 5-6 | 6-9 |

Excitab

Activité syn

APLP1 et APLP2 !



-80°C

Expression de l'APP

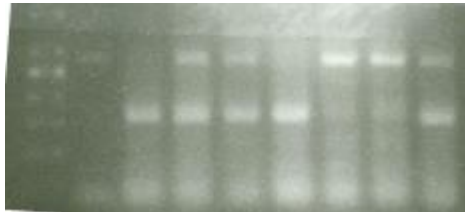
“Western-Blotting”

RT q-PCR

RÉSULTATS : GÉNOTYPAGE

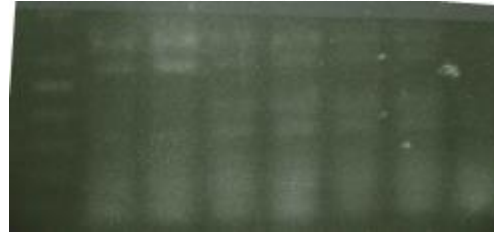
➤ ~~+/+~~ ou +/+ ?

p13/p14 + p36/p37



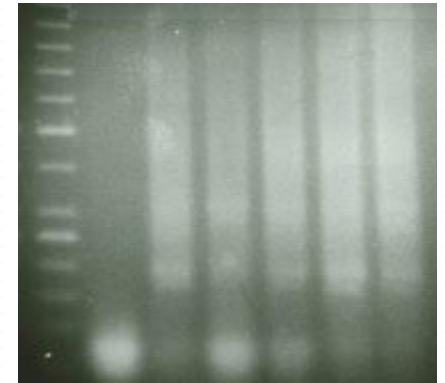
← Bande -
← Bande +

p13/p14 + p36/p37



ou

p13/p14 + p36/p37



p13/p14

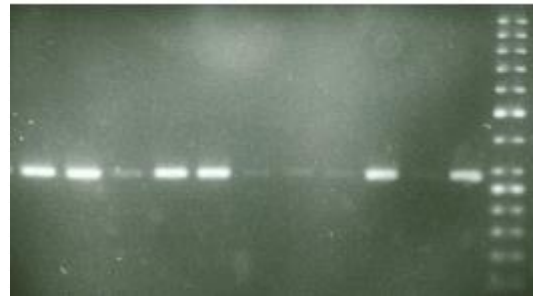
p36/p37



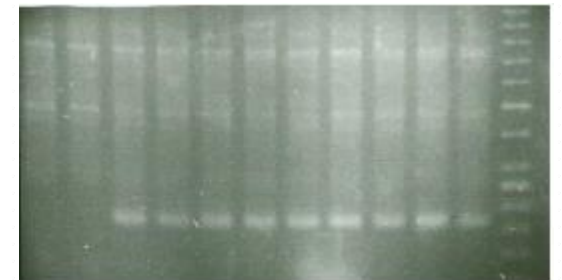
Bandes -

Bandes +

p13/p14



p36/p37



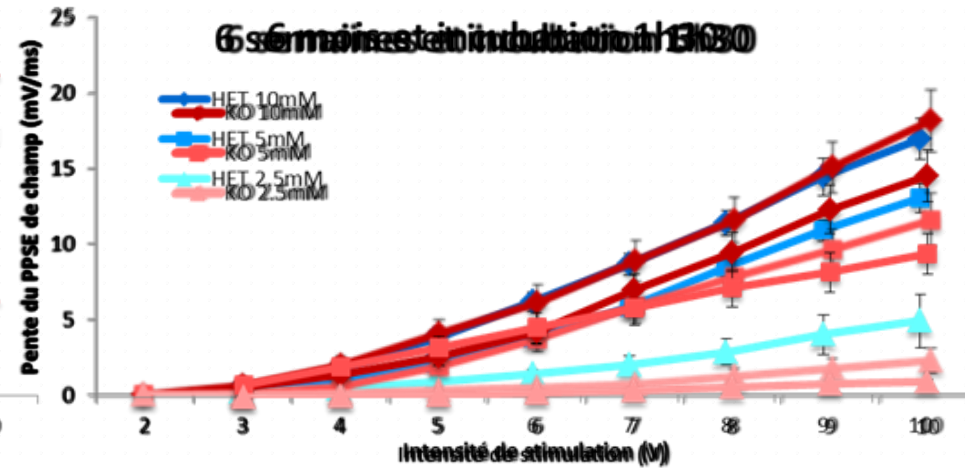
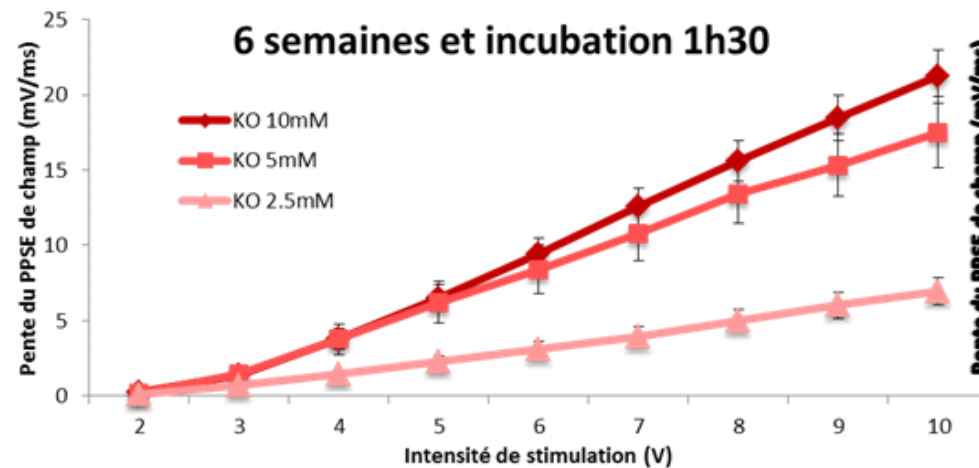
RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

« Input-output »

-/-

PPSE de champ → activité synaptique et excitabilité

+/-

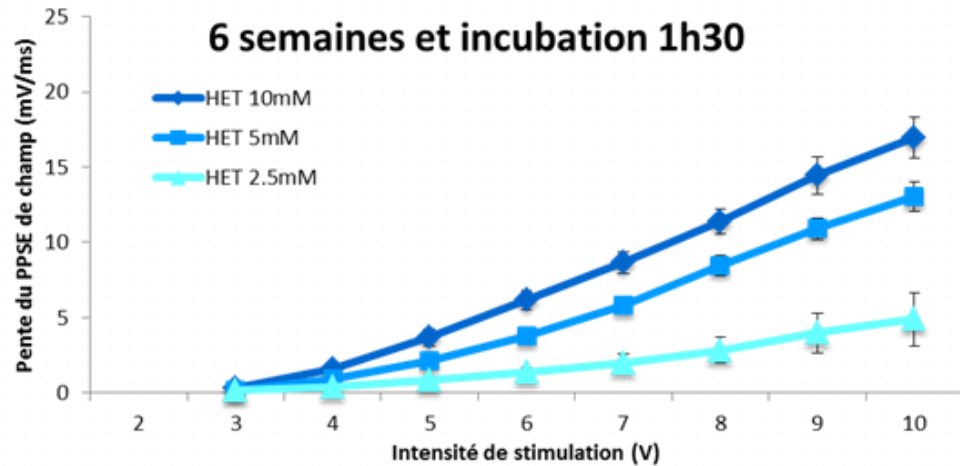


- Les valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique sont significativement inférieures pour les souris de 6 mois → Effet de l'âge ?
- L'excitabilité et/ou l'activité synaptique du réseau neuronal diminue
- Une hypoglycémie prolongée de 4h (sur souris jeunes) ne modifie pas significativement le résultat → Viabilité diminuée

RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

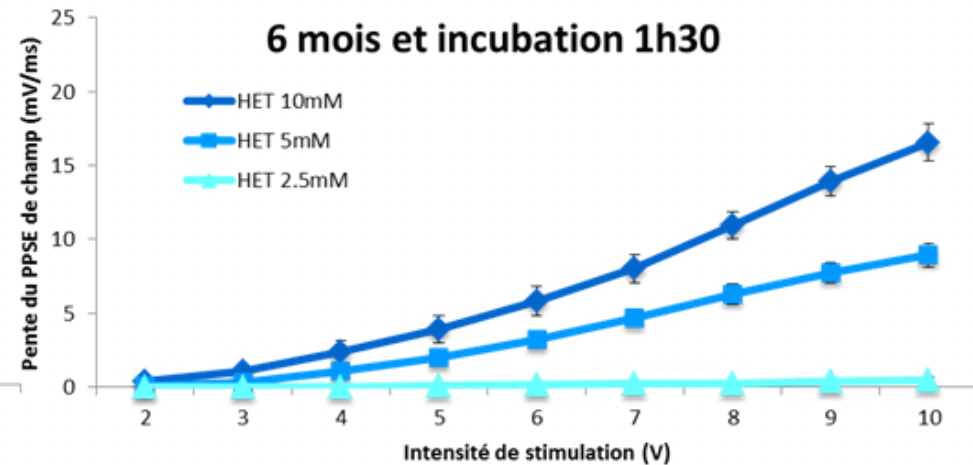
« Input-output »

+/-



PPSE de champ

+/-

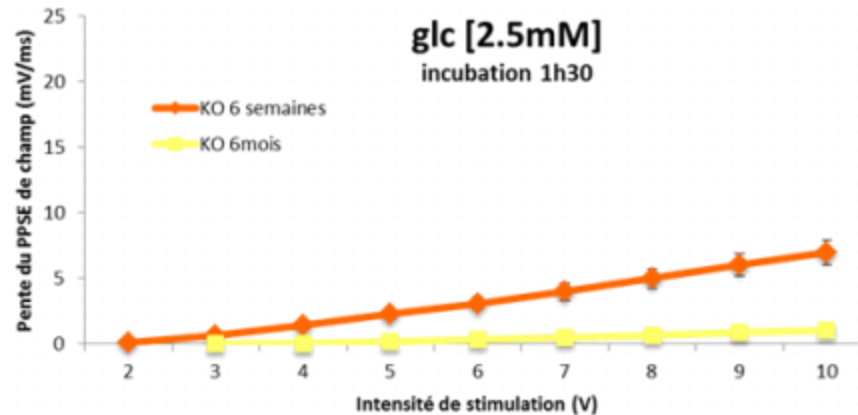
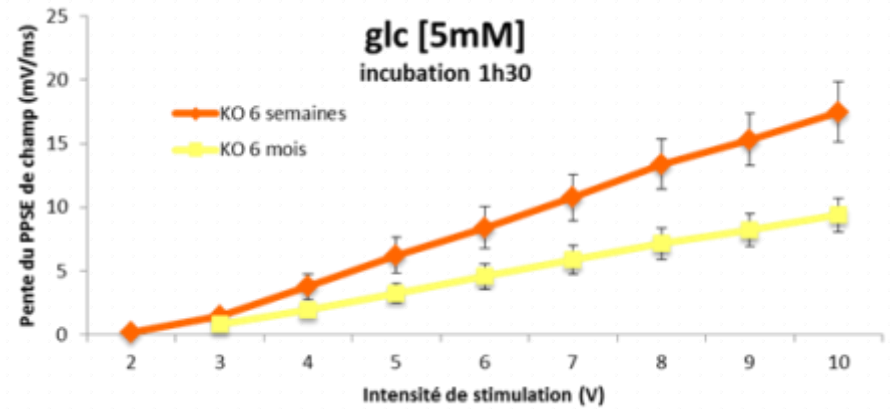
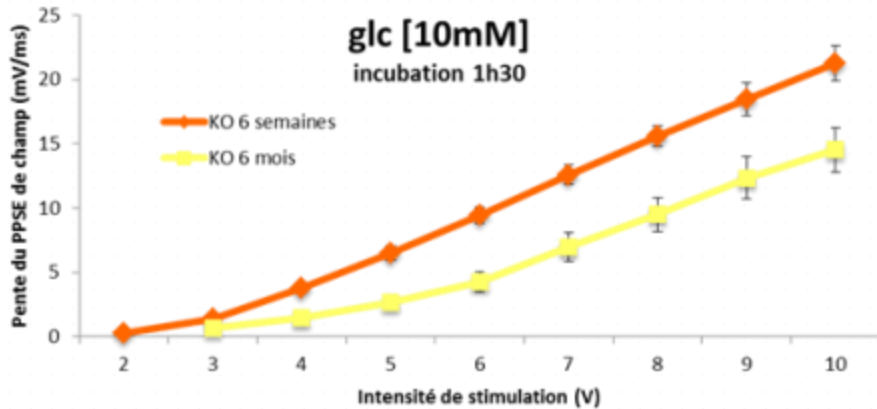


→ L'excitabilité et/ou l'activité synaptique du réseau neuronal diminue lorsque la concentration en glucose diminue

→ Les valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique sont significativement inférieures pour les souris de 6 mois (10mM) → Effet de l'âge ?

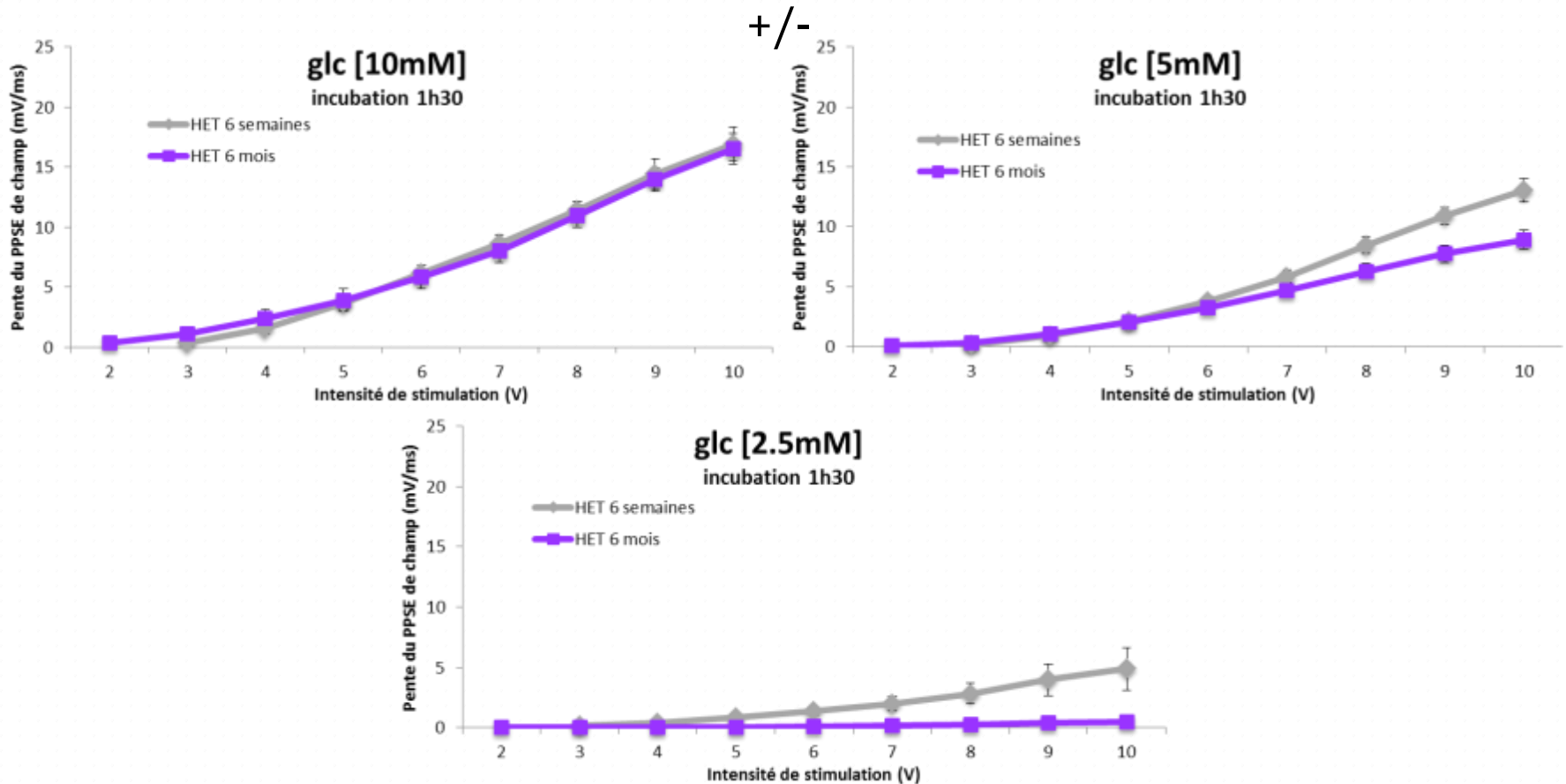
RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

-/-



→ Le vieillissement réduit l'excitabilité et/ou l'activité synaptique enregistrées sur tranches aigues d'hippocampe de souris dépourvues du gène fonctionnel de l'APP

RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE



→ Le vieillissement réduit l'excitabilité et/ou l'activité synaptique enregistrées sur tranches aigues d'hippocampe de souris ne possédant qu'un allèle fonctionnel de l'APP mais de manière moins frappante que pour les souris « knockout »

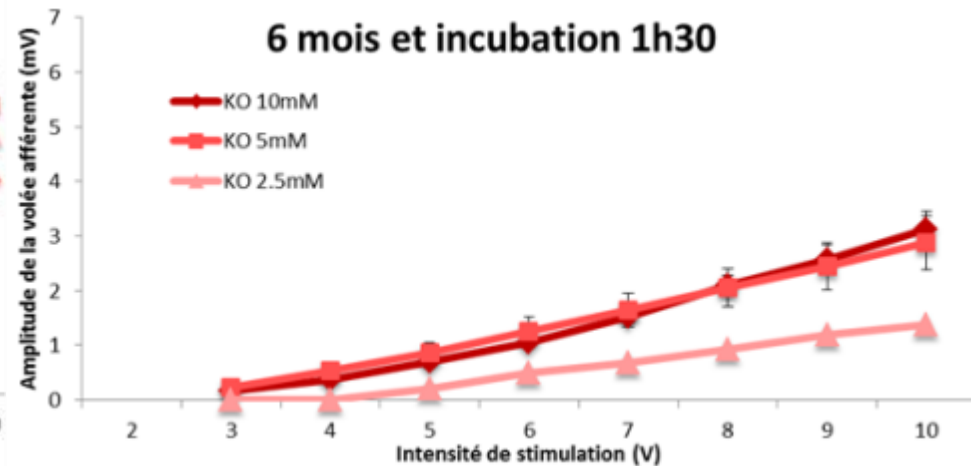
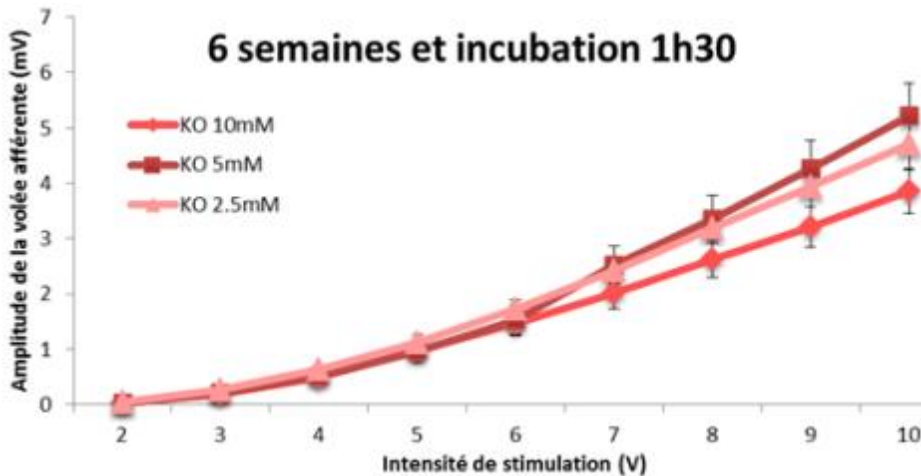
RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

« Input-output »

Volée afférente → Excitabilité

-/-

+/-



→ Une diminution de l'excitabilité des neurones du LCRa (surtout chez les souris à 10mM) pour la concentration de 10mM KO. En Mo, l'excitabilité est dans le LCRa et l'hypoglycémie sévère.

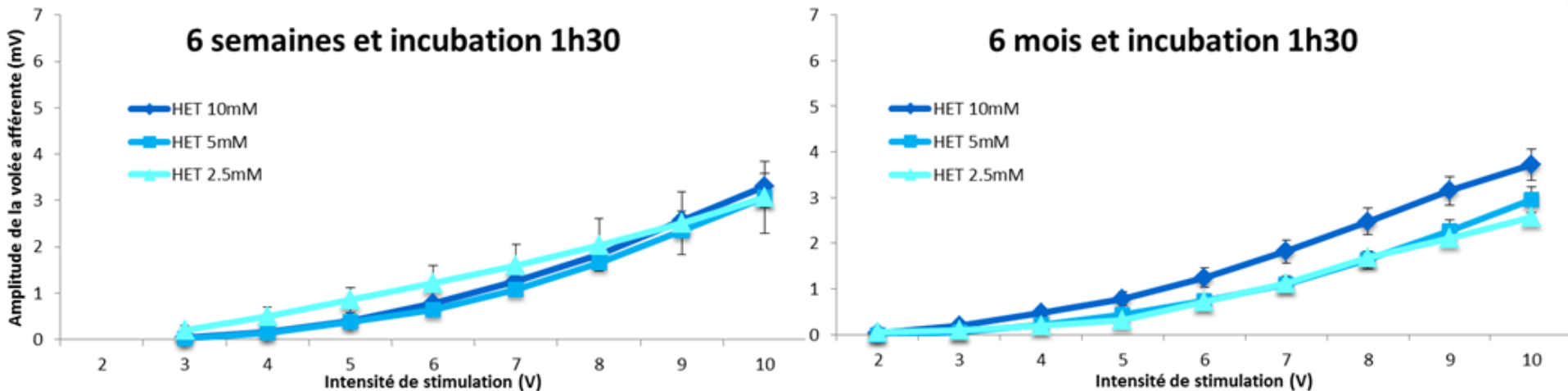
RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

« Input-output »

+/-

Volée afférente

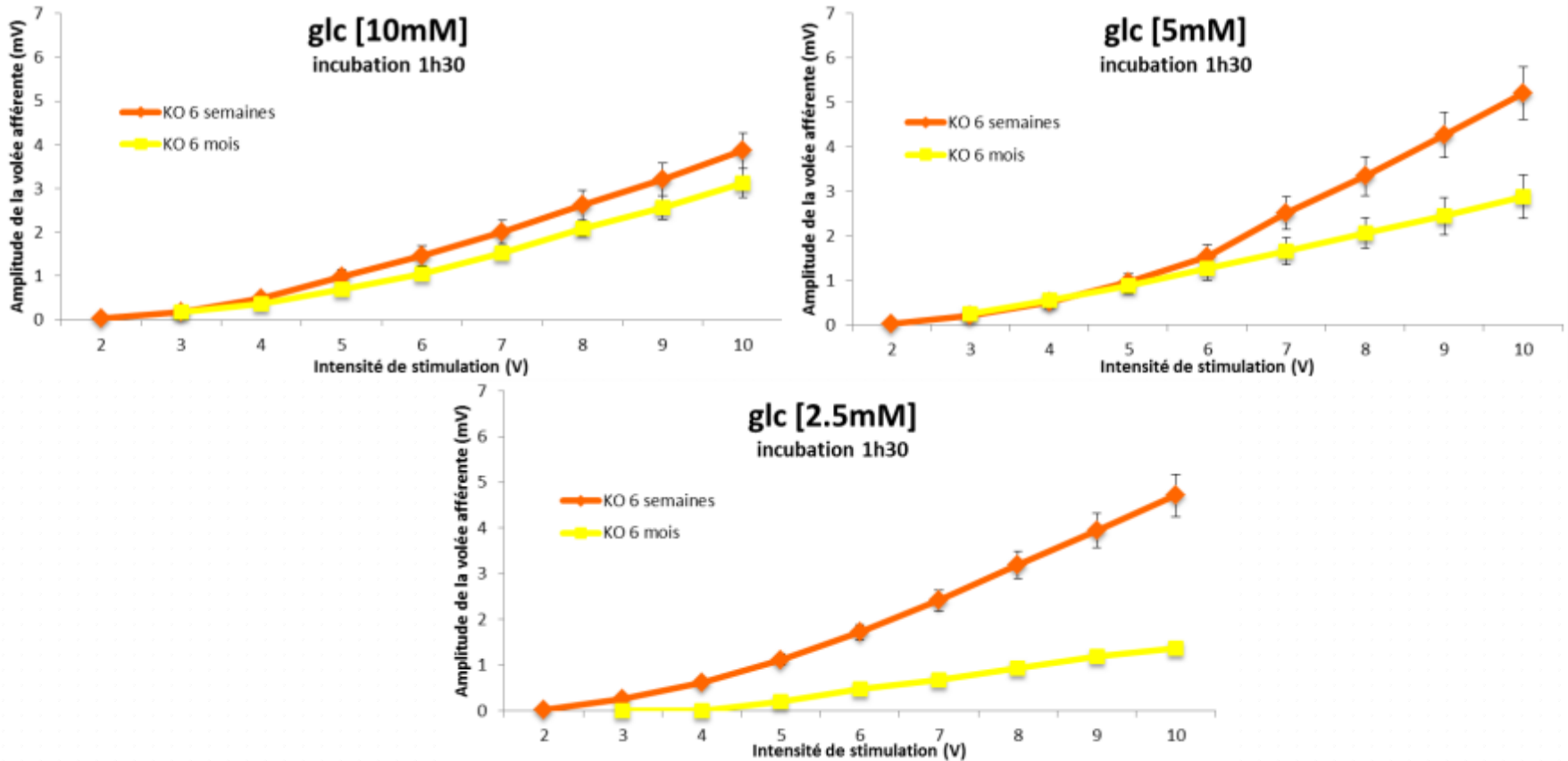
+/-



→ L'«âge» ne modifie pas l'excitabilité neuronale des souris hétérozygotes

RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

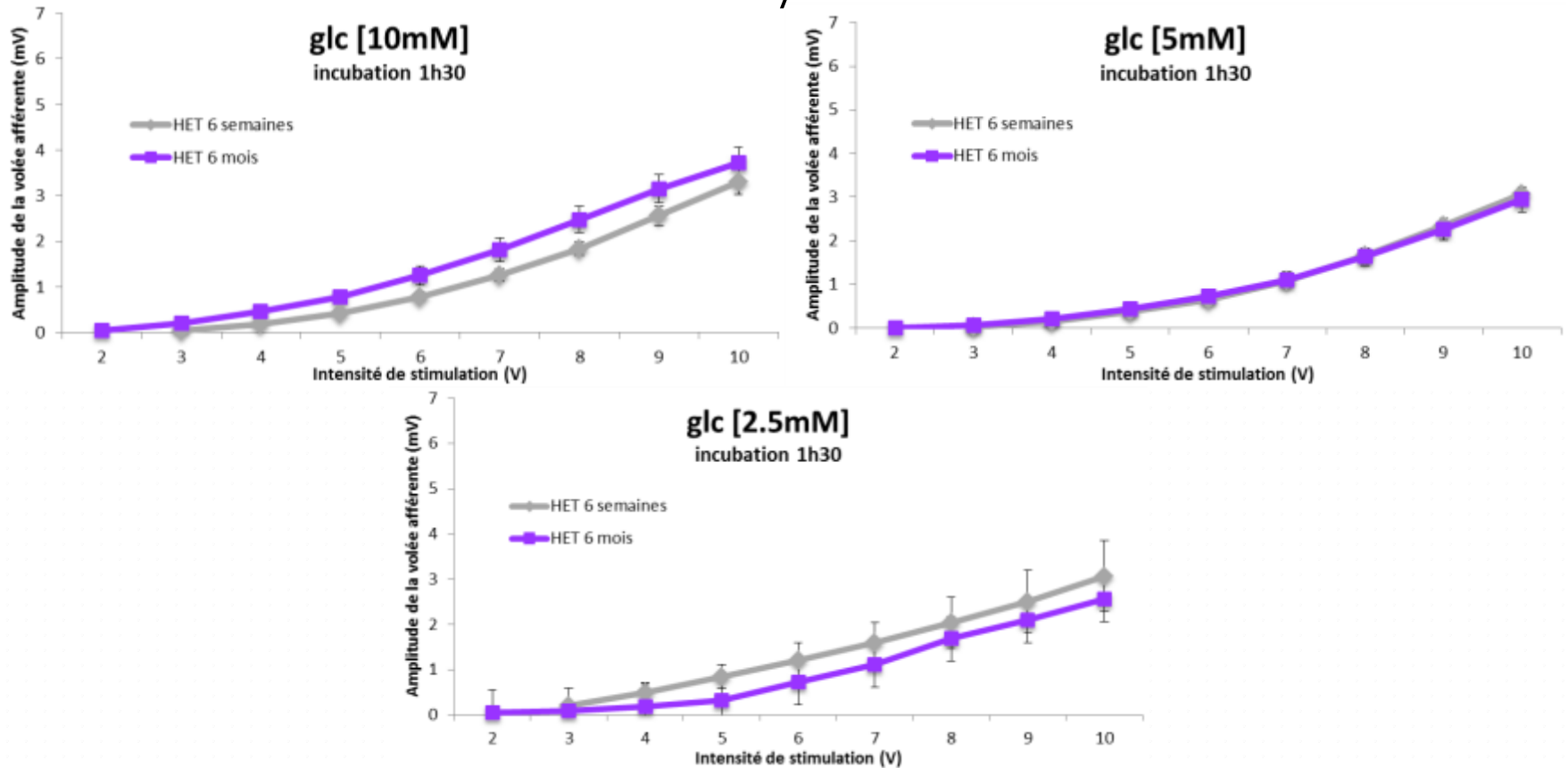
-/-



→ Le vieillissement a un effet significatif sur l'excitabilité pour les conditions hypoglycémiques chez les souris dépourvues en l'APP

RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

+/-

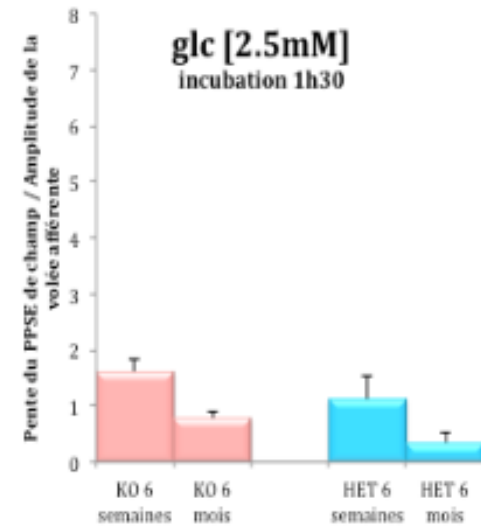
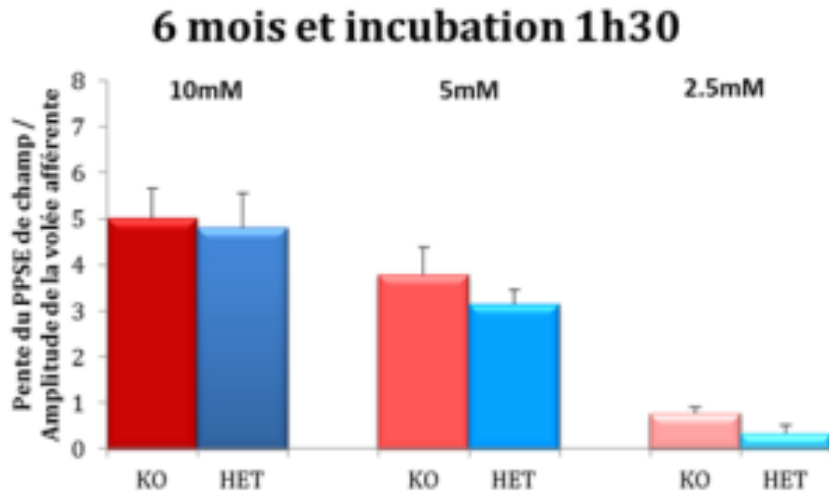


→ L'excitabilité se maintient chez les souris les plus âgées pour les différents LCRA chez les souris hétérozygotes

RÉSULTATS : ELECTROPHYSIOLOGIE

« Input-output » : stimulation 10V

Pente du PPSE de champ /
Amplitude de la volée afférente



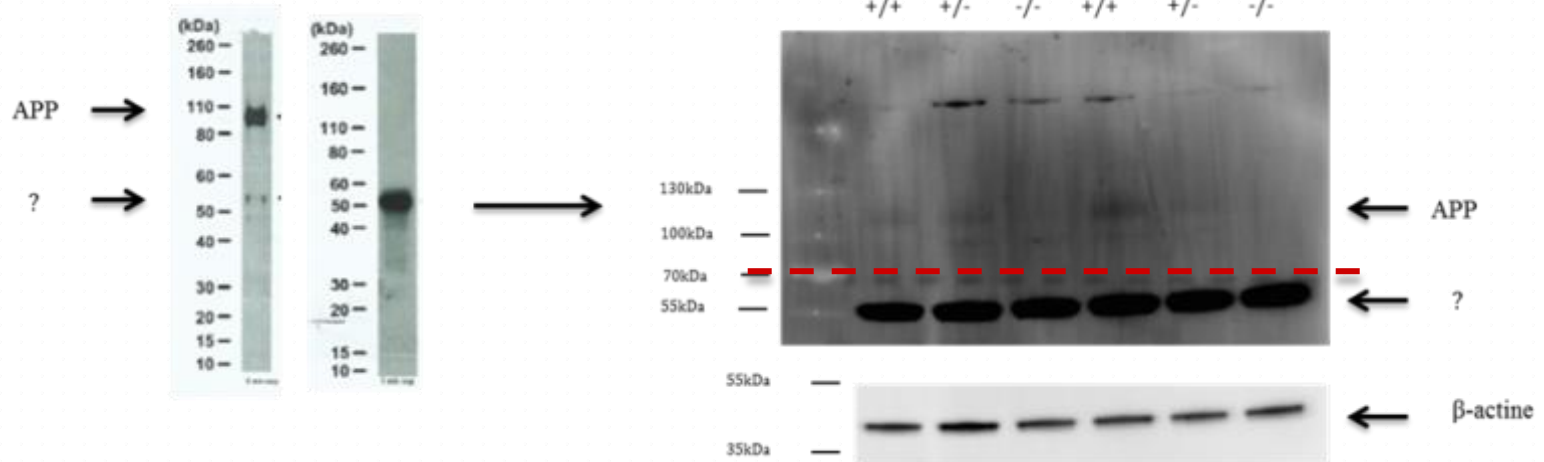
- La force de la dépolarisation postsynaptique décroît avec la concentration en glucose → synapse moins efficace
- La tendance est à la réduction de l'activité synaptique avec l'âge

RÉSULTATS : « WESTERN-BLOTTING »

➤ [APP] total : APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀ → ratios 1 / ½ / 0 et ↑ en hypoglycémie ?

- ❖ anticorps anti-APP (#2452, Cell Signaling), rabbit, 1:1000, MW 100-140kDa
- ❖ anticorps anti-APP (ab15272, Abcam), rabbit polyclonal, 1:200 (Stock : 200µg/ml), MW 87kDa
- ❖ anticorps anti-APP N_t (07-0667, Millipore), rabbit polyclonal, 1:2000 (Stock : 1mg/ml), MW 105/55kDa

10µg de protéines
Glucose [10mM]

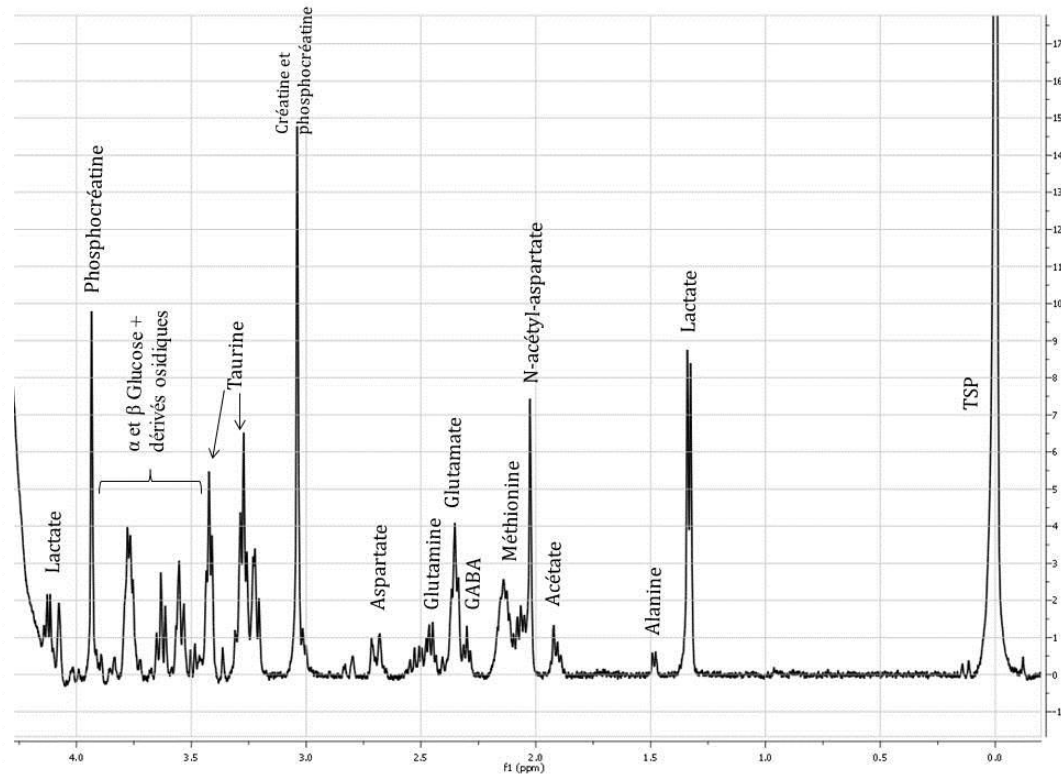


➤ APP₇₅₁, APP₇₇₀ (domaine KPI) → ↑ en hypoglycémie ?

- Anticorps anti-APP-KPI (ab12269, Abcam), rabbit polyclonal, 1:1000 (Stock : 1mg/ml), MW 116kDa

RÉSULTATS : RMN ^1H

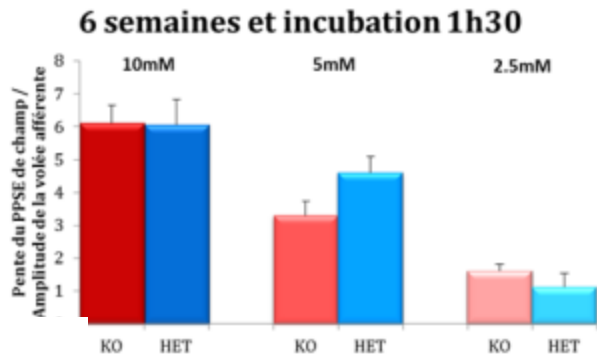
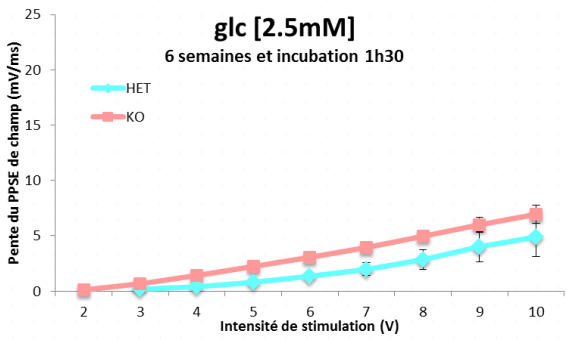
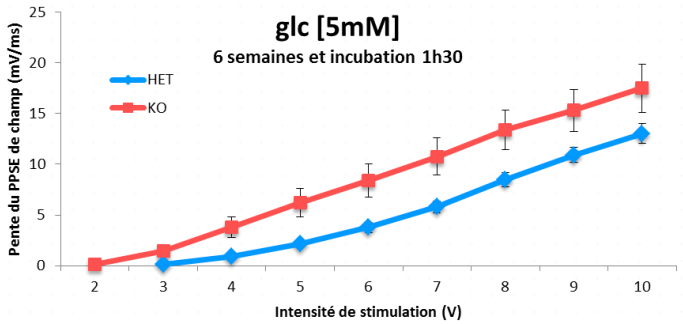
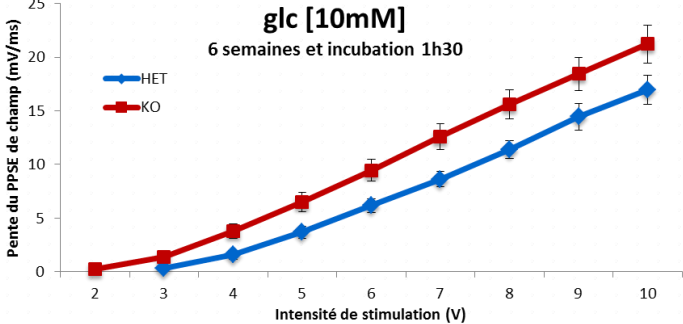
- Cage à métabolisme 72h, extraction CEM
- n = 3 hippocampes +/-, glucose [10mM]



- Urine et sérum

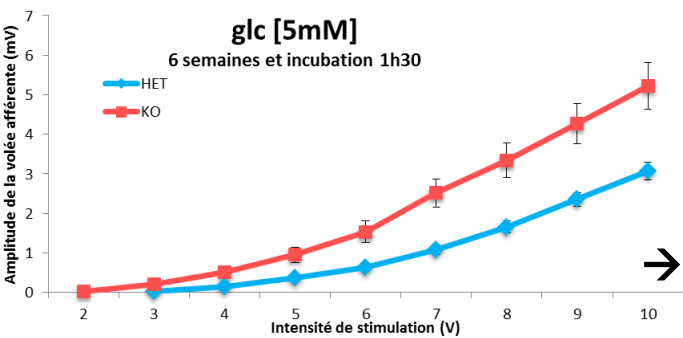
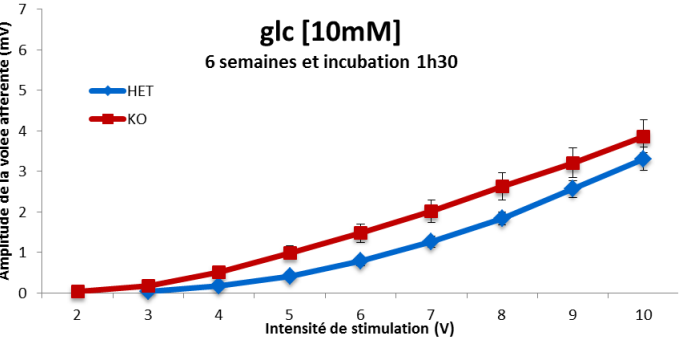
PERSPECTIVES

| | 2014 - 2015 | | | | | | | | | | | |
|--|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | O | N | D | J | F | M | A | M | J | J | A | S |
| Obtention des portées | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Génotypage | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Détermination de l'expression des isoformes de l'APP pour les différents génotypes et conditions expérimentales (hippocampes et tranches aiguës d'hippocampe) | | | | | | | | | | | | |
| « Input-output » des PPSE de champ et de volées afférentes | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| « Western-Blotting » | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| RT q-PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| Etude du métabolisme du glucose pour les différents génotypes et conditions expérimentales (tranches d'hippocampe) | | | | | | | | | | | | |
| Signature métabonomique par RMN du proton | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| Détermination de l'excitabilité synaptique par mesures électrophysiologiques (tranches aiguës d'hippocampe) | | | | | | | | | | | | |
| Effet des antagonistes des récepteurs NMDA (mémantine, APV et MK-801) | | | | | | | ■ | | | | | |
| Effet d'un antagoniste des récepteurs AMPA (NASPM) | | | | | | | ■ | | | | | |
| Etude de l'excitabilité par application de picrotoxine | | | | | | | | ■ | | | | |
| « Western-Blotting » | | | | | | | ■ | ■ | | | | |
| « Patch-clamp » des pompes Na ⁺ /K ⁺ ATPase et canaux K ⁺ ATP dépendants | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ |

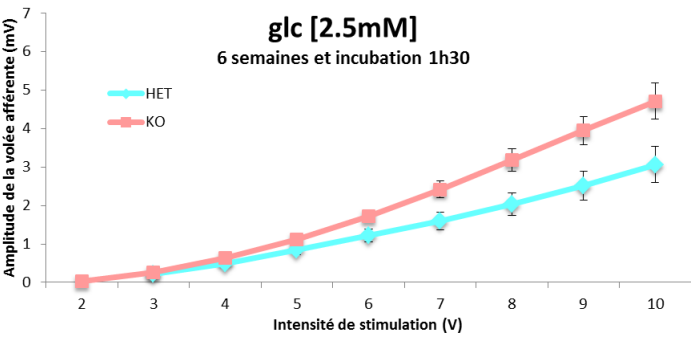


**PPSE de champ →
activité synaptique et
excitabilité**

Rapport → Activité synaptique



**→ Hyperexcitabilité chez les
souris -/- ?**



**Volée afférente →
Excitabilité**

Hypersensitivity to seizures in β -amyloid precursor protein deficient mice

Joachim P. Steinbach^{1,5}, Ulrike Müller^{2,5,6}, Marcel Leist²,
Zhi-Wei Li², Pierluigi Nicotera³ and Adriano Aguzzi^{1,4}

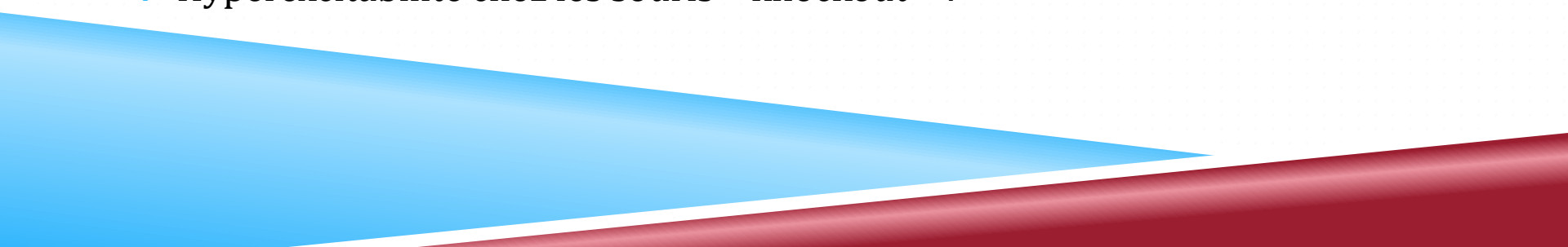
APP Knockout Mice Experience Acute Mortality as the Result of Ischemia

Maya A. Koike¹, Alexander J. Lin^{1,2,3}, Jonathan Pham^{2,3}, Elaine Nguyen², James J. Yeh²,
Rombod Rahimian², Bruce J. Tromberg^{2,3}, Bernard Choi^{2,3,4}, Kim N. Green^{1*}, Frank M. LaFerla^{1*}

CONCLUSION

- L'hypoglycémie altère la viabilité d'un réseau neuronal
 - Les effets sont plus marqués lorsque l'hypoglycémie est plus forte
 - La génération des potentiels d'action et la libération des neurotransmetteurs (excitabilité) se maintient jusqu'à une concentration faible en glucose tandis que l'activité synaptique décroît dès une faible hypoglycémie

 - Le vieillissement semble altérer ces paramètres chez les souris qui ne possède pas d'APP et les altère de façon moindre chez les souris possédant un des 2 allèles du gène
 - Maintien des paramètres chez les souris sauvages ?

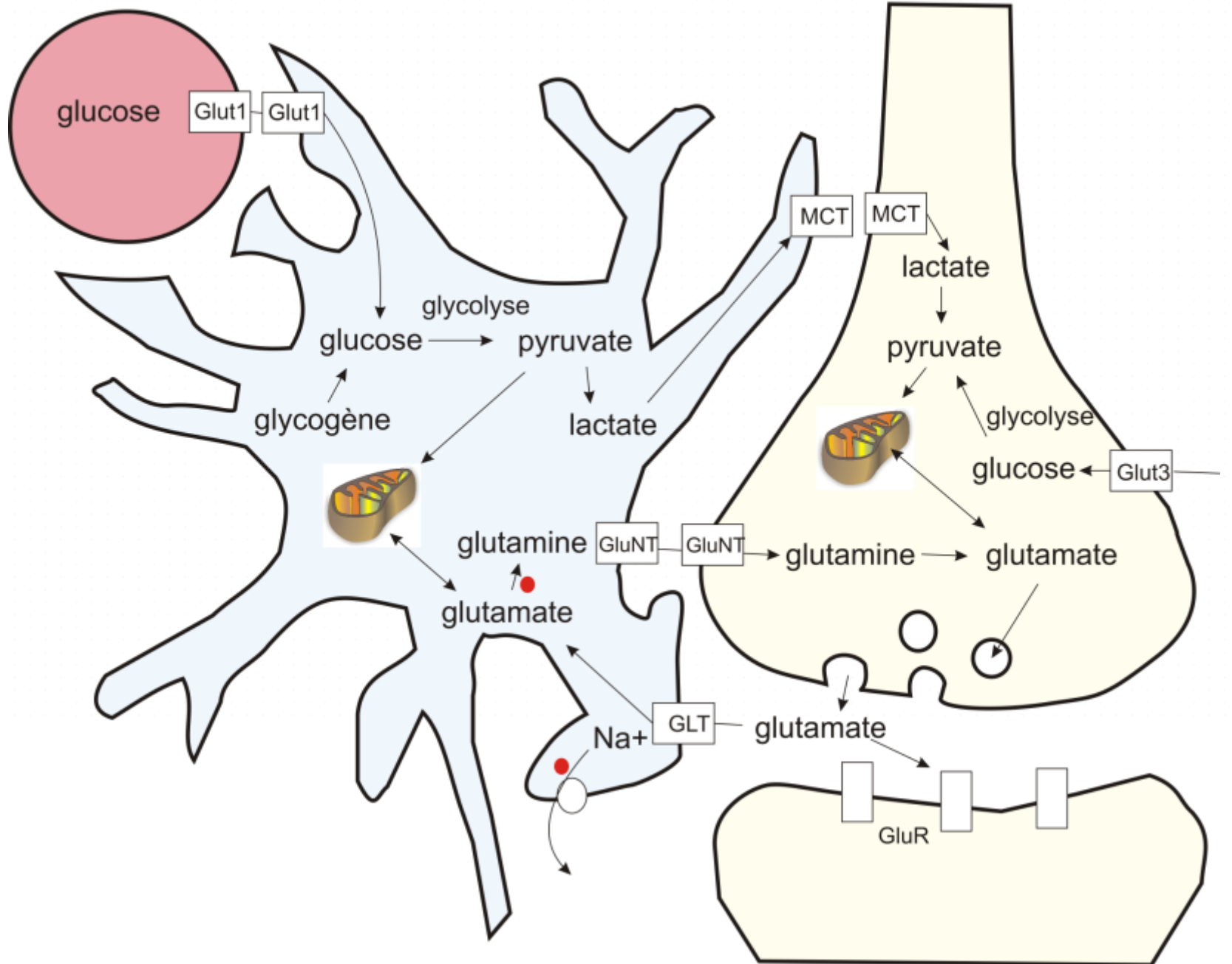
 - Hyperexcitabilité chez les souris « knockout » ?
- 

| | Avant | Après |
|---|----------------------|---------------------------------|
| ADN | 20ng | 10ng |
| [Amorces] | 5 μ M | 0.5 μ M |
| | p13/p14 + p36/p37 | p13/p14 ou p36/p37 |
| Gel de polyacrylamide | “Petit” | “Grand” |
| Dénaturation initiale (PCR gradient) | 1 minute | 5 minutes |
| Hybridation | 60°C, 15 secondes | 62°C, 5 secondes |
| | | Nouvelles cuves de migration |
| | | TAE froid |
| | | Nouveau lot d’amorces |
| Cycles PCR | 30 ou 35 | 30 ou 35 |
| | | ... |

vaisseau

astrocyte

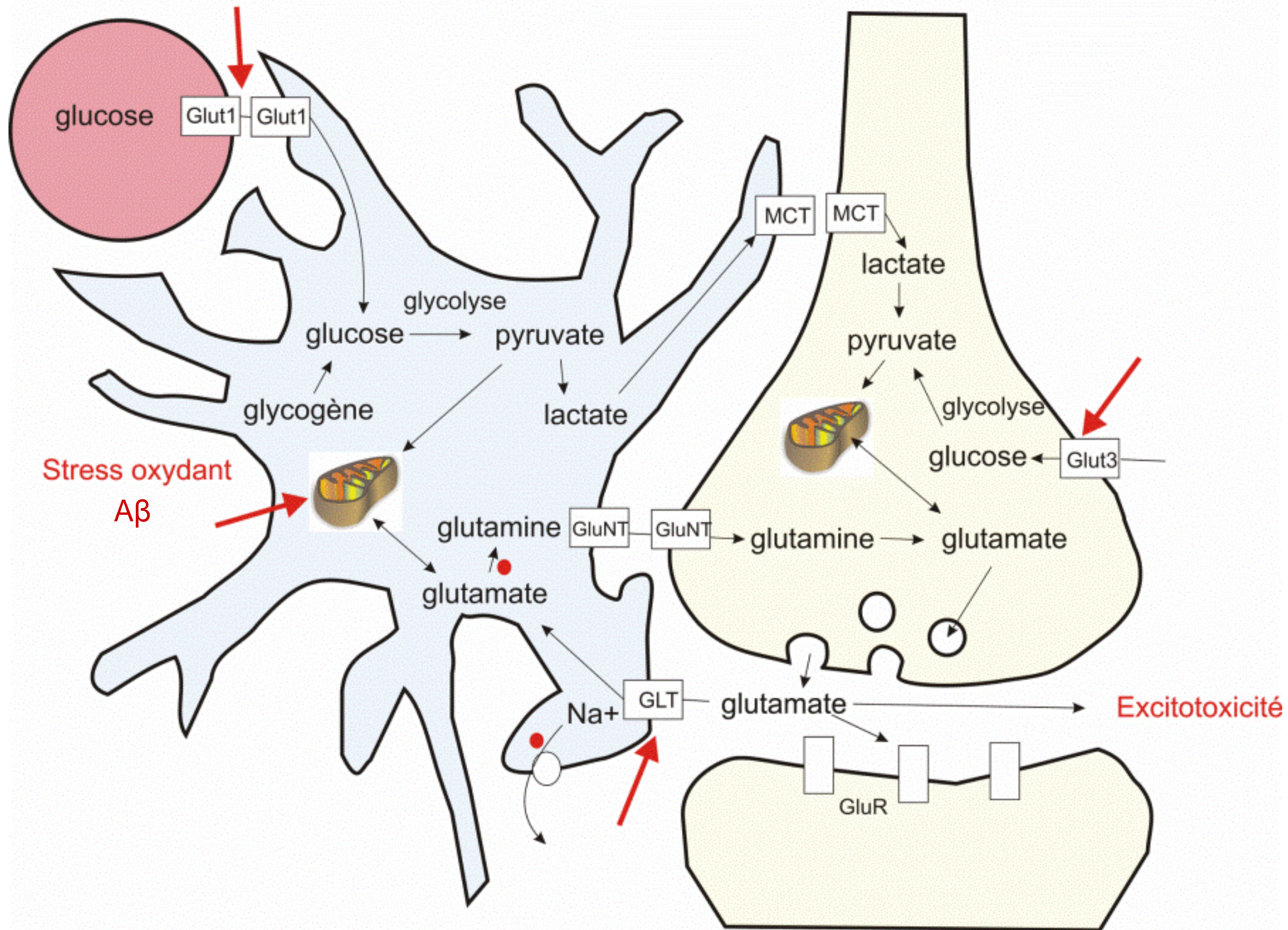
neurone



vaisseau

astrocyte

neurone



astrocyte

neurone

APP +/+
APP -/-
APP +/-

