

RAPPORT D'ACTIVITES POUR LA PROLONGATION DE LA 1RE BOURSE

Nom et prénom du proposant	Gloire Mélanie
Numéro de référence SEMAPHORE	19870000
Titre de la thèse	Le rôle ambivalent de la protéine précurseur du peptide β -amyloïde (APP) dans la régulation du métabolisme du glucose

1. RAPPEL DU PROJET DE RECHERCHES

Alors que les rôles délétères joués par le peptide β -amyloïde ($A\beta$) dans la maladie d'Alzheimer ont fait l'objet de nombreuses études, les fonctions réalisées par la protéine précurseur de ce peptide (APP) restent équivoques et fortement controversées. Les recherches actuelles indiquent que l'APP et les dérivés issus de sa protéolyse séquentielle seraient impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des gangliosides mais aussi, de manière moins bien établie, dans celui du glucose. Une dérégulation de cette fonction métabolique pourrait avoir une implication dans l'établissement ou le développement de la maladie d'Alzheimer. En effet, le cerveau des patients atteints par la pathologie présente un hypométabolisme général associé à un hypométabolisme du glucose. L'objectif principal de mon projet est d'étudier les dérégulations métaboliques et synaptiques corrélées avec la quantité de production de la protéine précurseur du peptide β -amyloïde ou de l'un de ses dérivés.

2. METHODOLOGIE GENERALE DES EXPERIENCES DE LA PREMIERE ANNEE

Le matériel de base est la tranche aigue d'hippocampe maintenue artificiellement en vie dans du liquide céphalorachidien artificiel (LCRa) chauffé, oxygéné et renouvelé continuellement. Pour atteindre mon objectif, les tranches sont incubées dans du LCRa composé de diverses concentrations en glucose : 10mM (condition non hypoglycémique), 5mM (condition d'hypoglycémie intermédiaire) et 2.5mM (condition d'hypoglycémie sévère) et ce, uniquement durant la période de récupération à la dissection (1h30) ou sur une durée plus longue (5h30) afin de déterminer l'effet d'une hypoglycémie courte ou prolongée sur la viabilité de celles-ci en termes d'excitabilité, d'activité synaptique et de l'expression de l'APP. Ceci est donc entrepris pour les 3 génotypes de souris dont je dispose, à savoir des souris B6.129S7 +/+ (sauvages), +/- *App^{tm1Dbo}/J* (hétérozygotes) et *App^{tm1Dbo}/J* / *App^{tm1Dbo}/J* (« knockout »). Ces différents paramètres sont appliqués pour des souris âgées de 6 semaines et de 6 mois afin d'établir si le vieillissement modifie les effets de l'hypoglycémie ou la régulation de l'APP. Les différentes variables sont reprises dans le tableau ci-dessous :

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

Les tranches sont disposées dans une installation permettant de réaliser des mesures électrophysiologiques. À la fin de chaque expérience, elles sont préservées afin d'être étudiées par « Western-Blotting », RT q-PCR (quantification des ARNm de l'APP et de ses protéines) et RMN (métabonomique). L'incubation de ces tranches en hypoglycémie a pour objectif d'observer une modification de l'expression en APP mais également en métabolites. En effet, la littérature démontre que l'hypoglycémie augmente l'expression de l'ARNm de l'APP. Cette information est essentielle car une régulation de l'APP par l'hypoglycémie a toute son importance dans le cadre de la maladie d'Alzheimer où l'APP est un des acteurs principaux si pas l'acteur principal. Effectivement, parmi tous les symptômes de cette pathologie, des régions cérébrales telles que le cortex et l'hippocampe

souffrent d'un hypométabolisme général dû à un déficit énergétique causé par un hypométabolisme du glucose. Aujourd'hui, la relation cause-conséquence entre l'expression de l'APP et l'hypoglycémie cérébrale n'est pas encore clairement établie. L'utilisation de tranches d'hippocampes contenant plus ou moins d'APP voire pas du tout et plongées en simulation d'hypoglycémie pourrait donc aboutir à une meilleure compréhension de ce lien et donc de la maladie.

3. RESULTATS OBTENUS AU COURS DE L'ANNEE 2013-2014

3.1. Obtention du certificat d'université en sciences des animaux de laboratoire

Lors de cette année académique, j'ai suivi les cours et les travaux pratiques du cours de formation en expérimentation animale (80h) et obtenu le certificat d'université en sciences des animaux de laboratoire me permettant de manipuler seule des animaux de laboratoire.

3.2. Obtention d'animaux et mise au point du protocole de géotypage

Les premiers accouplements de souris hétérozygotes ont été réalisés avant l'obtention de la bourse afin de disposer d'animaux (38 souris) dès la fin de l'année 2013. Les expériences électrophysiologiques sur tranches aigues d'hippocampes ont débuté au mois de novembre 2013 sur des souris âgées de 6 semaines (cf. section 3.4) et au mois de janvier 2014 sur des souris âgées de 6 mois.

Le protocole de géotypage a été adapté à la suite de ces premières expériences car les bandes résultant de l'électrophorèse n'étaient pas nettes (comme déjà observé au cours du mémoire). Pour déterminer le géotype avec un niveau de certitude supérieur, différents paramètres du géotypage ont été améliorés en collaboration avec le service de biologie moléculaire du Prof. Belayew (UMONS). Par exemple, les amorces (p13/p14 et p36/p37) et l'ADNg ont été utilisés à plus faible concentration (0.5µM d'amorces et 10ng d'ADN), la température de l'étape d'hybridation a été augmentée de 2°C et la durée de celle-ci réduite à 5 secondes, l'étape de dénaturation initiale a été rallongée (5 minutes)... D'autres paramètres comme l'utilisation d'un nouveau lot d'amorces et de nouvelles cuves de migration entrent également en jeu (figure 1).

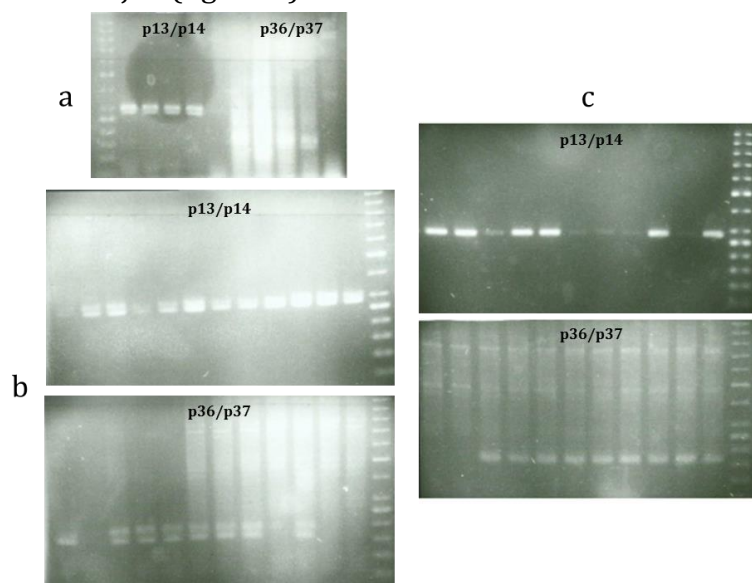


Figure 1. Résultat de 3 géotypages de souris B6.129S7. a et b mettent en évidence les problèmes rencontrés avant d'avoir terminé d'optimiser les paramètres et c le résultat obtenu après modification de tous ces paramètres. Dans les deux cas, on observe un dédoublement des bandes. En a, un « smir » recouvre les bandes sauvages (p36/p37) et les rend indistinguables et en b, on retrouve deux intensités d'amplification pour la bande supérieure (-/- ; p13/p14), rendant difficile l'interprétation du géotype sauvage. En c, les problèmes cités sont fortement atténués, ce qui permet de déterminer avec certitude les différents géotypes.

Remarque :

Jusqu'ici, les accouplements entre souris hétérozygotes n'ont permis d'obtenir que quelques individus sauvages. Aussi, certains génotypes sont toujours incertains (+/+ ou +/-). Les enregistrements électrophysiologiques de ces individus n'ont pas encore été joints à l'un ou l'autre groupe expérimental. De ce fait, les résultats des souris sauvages ne seront pas présentés cette année. Cependant, 10 souris sauvages seront âgées de 6 mois fin septembre et seront sacrifiées dès cette date. D'autres souris « knockout » et hétérozygotes atteindront l'âge de 6 mois fin septembre et pourront donc rapidement être utilisées pour les expériences électrophysiologiques où la période d'incubation est longue (5h30) (cf. section 3.4). Aussi, de nouveaux reproducteurs nous seront fournis fin septembre 2014 par l'Institut des Neurosciences de l'UCL (IoNS, Prof. Octave). Des accouplements entre souris sauvages seront immédiatement effectués pour compléter les expériences « souris de 6 semaines » manquantes.

3.3. « Western-Blotting »

La quantification de l'APP par « Western-Blotting » a été testée au départ de souris âgées de 6 semaines. La première étape visait à quantifier la protéine dans des conditions non-hypoglycémiques (10mM de glucose), sans dérèglement du métabolisme lié à l'âge (6 semaines) et ce, afin de confirmer le ratio d'expression 1/1/2/0 préalablement établi entre les souris sauvages, les hétérozygotes et les « knockout ». Dans un premier temps, seuls des échantillons d'hippocampes entiers ont été déposés sur gel afin d'établir si la découpe en tranches induit à elle seule une modification de l'expression de la protéine.

Le premier anticorps testé est un anticorps anti-APP (#2452, Cell Signaling) supposé reconnaître spécifiquement les 3 isoformes cérébraux de l'APP ainsi que les formes immatures. Néanmoins, cet anticorps était totalement aspécifique. En effet, en l'utilisant sur mes échantillons, une seule bande a été obtenue et celle-ci ne correspondait ni au précurseur, ni à l'un de ses dérivés puisque elle était présente dans chacun des puits (donc même pour les -/-) et ce, dans la même gamme de concentrations. De plus, elle se situait à la moitié du poids moléculaire attendu. Le contrôle de charge était correct (β -actine). Une mauvaise extraction de l'APP ne devrait pas être la cause de ce résultat car le tampon d'extraction est riche en détergents et extrait de manière courante les protéines membranaires. De plus, les formes solubles de l'APP, normalement reconnues, n'ont pas été marquées par l'anticorps. Un dépôt d'une quantité plus grande de protéines, une dilution moins forte de l'anticorps ou une adaptation du protocole ne sera donc pas tentée (figure 2).

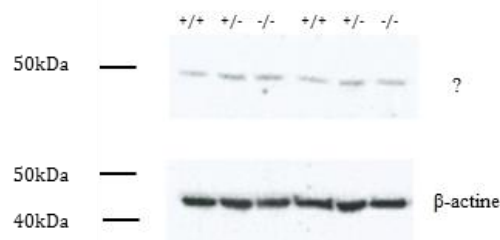


Figure 2. "Western-Blotting" réalisé au départ de 10 μ g de protéines provenant de 2 hippocampes entiers de souris +/+, +/- et -/- congelés immédiatement après leur dissociation du reste du cerveau dans du LCRA contenant 10mM de glucose. Haut : utilisation de l'anticorps anti-APP de la firme Cell Signaling à une dilution de 1:1000 et bas : utilisation d'un anticorps anti- β -actine de la firme Sigma-Aldrich à une dilution 1 :5000.

Un autre anticorps de la firme Abcam a été testé (ab15272) dans le but de reconnaître les 3 isoformes de l'APP. Cette fois, l'APP pourrait avoir été marqué par l'anticorps mais s'il l'est, il est masqué par une forte aspécificité donc non identifiable.

Enfin, un anticorps anti-APP N_t de chez Millipore a été testé (07-0667). Celui-ci montre un signal aspécifique très fort à 55kDa. Le temps d'exposition calculé par la développeuse automatique s'est

alors calibré sur ce signal et a rendu peu visible le signal de l'APP. Cependant, le ratio semble apparaître. Lors du prochain essai, 20µg de protéines seront déposés dans chacun des puits et la membrane de nitrocellulose sera coupée horizontalement à environ 70kDa afin d'éviter ce signal aspécifique et sera analysée par la développeuse classique si besoin est (figure 3).

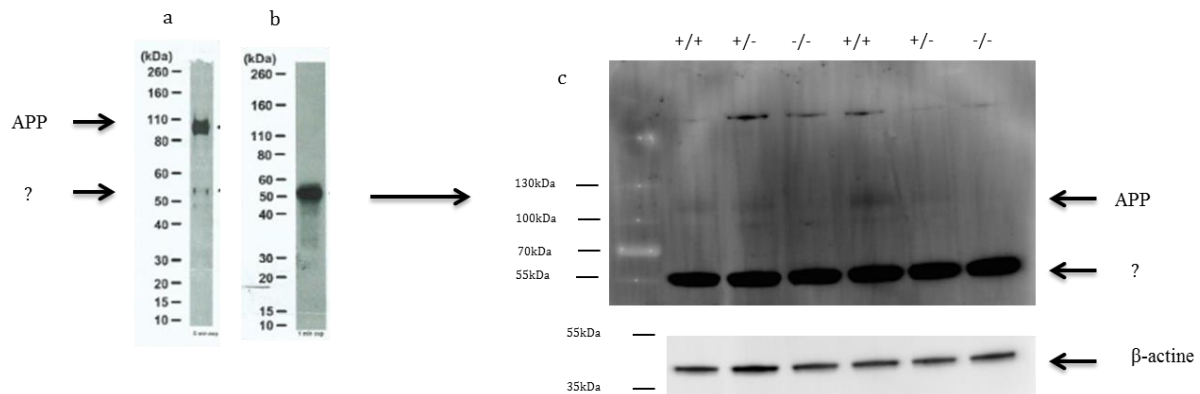


Figure 3. « Western-Blotting » utilisant l'anticorps anti-APP Nt de la firme Millipore. a et b sont les résultats attendus par « Western-Blotting » (lysate de cerveau humain fœtal, utilisation d'une membrane de PVDF, dilution 1 :10000 de l'anticorps, exposition 5minutes et détection par chimiluminescence) et immunoprécipitation respectivement. La photographie c représente le « Western-Blotting » réalisé au départ de 10µg de protéines provenant de 2 hippocampes entiers de souris +/+, +/- et -/- congelés immédiatement après leur dissociation du reste du cerveau dans du LCRa contenant 10mM de glucose. Le transfert a été effectué sur une membrane de PVDF et l'anticorps a été utilisé à une dilution de 1:2000. Le contrôle de charge a été effectué à l'aide de l'anticorps anti-β-actine de la firme Sigma-Aldrich à une dilution 1 :5000.

L'anticorps utilisé par l'équipe de Zheng (non spécifique des isoformes) lors de la caractérisation initiale des souris APP « knockout » en 1995 est malheureusement indisponible. Cependant, l'anticorps provenant de la firme Millipore est prometteur mais si toutefois un résultat satisfaisant ne parvient pas à être obtenu en l'utilisant, nous commanderons un anticorps anti-APP utilisé couramment dans le laboratoire du Prof. Octave : A8717, Sigma-Aldrich.

Un anticorps anti-KPI a été testé (ab12269, Abcam). Celui-ci doit reconnaître spécifiquement les isoformes contenant le domaine KPI, à savoir les isoformes contenant 751 et 770 acides aminés mais les protéines avaient été décollées par 2 stripping successifs. Cette expérience sera réitérée après qu'un résultat correct soit obtenu en utilisant un anticorps marquant les 3 isoformes.

3.4. RT q-PCR

Les expériences de PCR n'ont pas encore été effectuées. Néanmoins, j'ai construit les amorces spécifiques de chacune des isoformes cérébrales de l'APP : APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀. Puisque ces différentes isoformes proviennent d'un épissage alternatif de l'ARNm de l'APP, les amorces anti-sens sont construites de façon à reconnaître des jonctions exons-exons spécifiques (APP₆₉₅ : 6-9 ; APP₇₅₁ : 7-9 ; APP₇₇₀ : 8-9). L'homologie avec les APLP1 et APLP2 a été évitée afin d'empêcher une reconnaissance aspécifique des homologues. Ces amorces seront prochainement testées en RT q-PCR afin de quantifier le niveau d'expression de l'ARNm des différents isoformes de l'APP dans les diverses conditions d'hypoglycémie.

3.5. Electrophysiologie

3.5.1. Méthodologie

La potentialisation à long terme (LTP) n'a pas été mesurée lors de la restriction plus ou moins forte en glucose car aucune divergence notable n'avait été mise en évidence au cours de mon mémoire. Le paramètre utilisé afin d'évaluer l'excitabilité et la transmission synaptique (et donc la viabilité) sur les tranches d'hippocampes a été l'« input-output ». Pour rappel, celui-ci correspond classiquement à la

courbe obtenue par la mesure de la croissance de la dépolarisation postsynaptique d'une population de neurones (PPSE de champ) en fonction de l'intensité croissante de la stimulation (V). La gamme d'intensités de stimulation choisie s'étale de 2V à 10V et la dépolarisation a été enregistrée pour chaque palier de 1V. L'« input-output » de la pente ou de l'amplitude du PPSE de champ est un témoin de l'activité synaptique du réseau neuronal ET de l'excitabilité des axones stimulés. L'« input-output » de la volée afférente, témoin du passage des potentiels d'action au sein des fibres stimulées, permet de mesurer leur excitabilité. De ce fait, le rapport entre l'« input-output » de la pente du PPSE de champ et celui de l'amplitude de la volée afférente apporte une information sur l'efficacité synaptique. La volée afférente précède toujours la dépolarisation post-synaptique de quelques ms et donc les 2 paramètres sont enregistrés sur un même tracé.

Techniquement, jusque 4 « input-output » peuvent être enregistrés dans la région CA1 d'une même tranche d'hippocampe. Leur nombre varie alors de 2 à 4 en fonction de la taille de la tranche. Les « input-output » d'une même tranche sont moyennés pour donner une courbe d'« input-output » par tranche et les moyennes de ces « input-output » de tranches sont moyennées pour les 3 tranches présentes dans la même cuve d'enregistrement. 6 tranches viables peuvent être obtenues par hippocampe. Ainsi, il est possible d'enregistrer jusque 3 tranches x2 chambres x4 « input-output » = 24 « input-output » par animal sacrifié. Le nombre statistique « n » du groupe définit le nombre de tranches analysées.

Les enregistrements sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM. Le seuil α de significativité a été fixé à 0.05. En fonction du type de distribution, la comparaison entre 2 groupes a été effectuée au moyen d'un t-test ou d'un test de Mann-Whitney et la comparaison entre 3 groupes par un test d'ANOVA à un facteur couplé à un test de Newman-Keuls ou d'un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn. Dans le cas où cela n'est pas précisé, le test statistique est effectué sur l'intensité de stimulation maximale : 10V. Le degré de significativité du test augmente avec l'intensité de stimulation mais seule la valeur P de l'intensité de stimulation à partir de laquelle la différence devient significative sera présentée.

3.5.2. Résultats

Comme cité précédemment, les résultats des souris sauvages ne seront pas présentés car incomplets. De même, les expériences d'incubation 5h30 sur des souris de 6 mois n'ont pas encore été effectuées. Les valeurs obtenues avec un n inférieur à 10 tranches (minimum 4 souris) seront complétées. Malgré cela, des informations peuvent déjà être tirées des expériences effectuées.

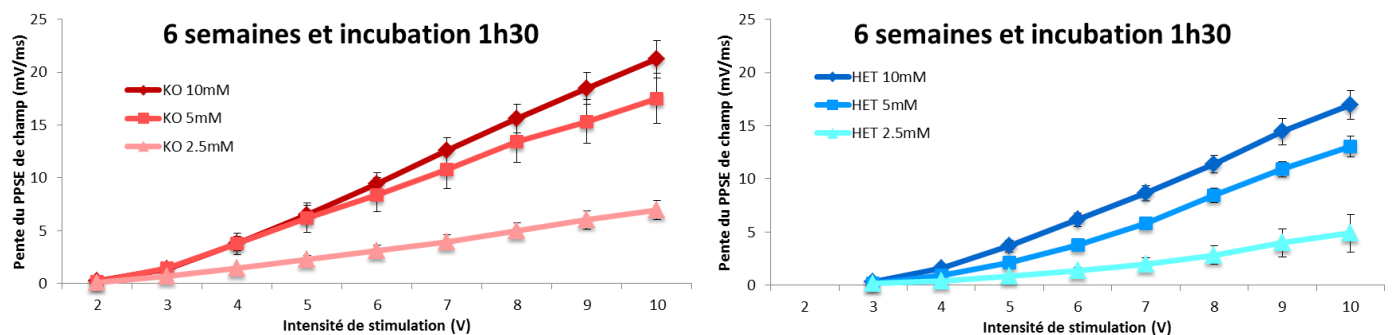


Figure 4. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris -/- (gauche) et +/- (droite) de 6 semaines incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=20 ; KO 5mM : n=14 ; KO 2.5mM : n=17 ; HET 10mM : n=24 ; HET 5mM : n=23 ; HET 2.5mM : n=5)

L'excitabilité et/ou l'activité synaptique du réseau neuronal diminue lorsque la concentration en glucose diminue. Puisque présenter une certaine excitabilité et une activité synaptique décelable est essentiel au bon fonctionnement d'un réseau neuronal, on peut en conclure que l'hypoglycémie

cause un dysfonctionnement du réseau neuronal. Cette dégradation est particulièrement marquée en hypoglycémie sévère (2.5mM). En effet, la perte d'excitabilité et/ou d'activité synaptique est statistiquement significative lors du passage 10mM > 2.5mM (dès 5V pour les KO et dès 6V pour les HET). Celle-ci est également statistiquement significative lors du passage 5mM > 2.5mM (dès 5V pour les KO et dès 7V pour les HET). Cette concentration faible en glucose provoque donc des changements profonds dans la viabilité de la tranche. Les tests d'ANOVA à un facteur sont significatifs à $P = <0,001$ dès les intensités de stimulation citées.

La perte d'excitabilité et/ou d'activité synaptique est plus faible (mais présente) lors du passage à l'hypoglycémie douce. La concentration intermédiaire en glucose semble produire des effets restreints sur la viabilité des tranches. Une tendance à la diminution lors du passage de 10mM à 5mM est visible à la fois chez les KO et chez les HET mais n'est jamais significative.

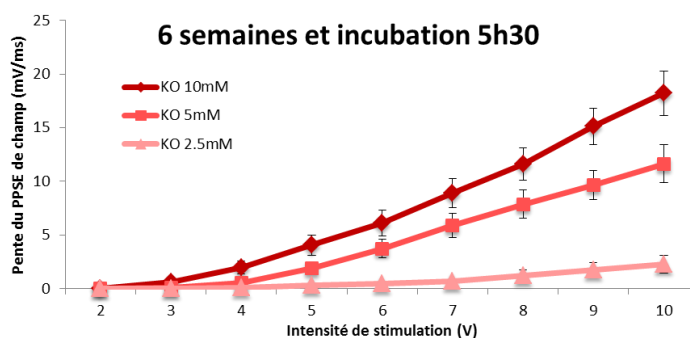


Figure 5. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- de 6 semaines incubées 5h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=12 ; KO 5mM : n=8 ; KO 2.5mM : n=7)

Une incubation en hypoglycémie prolongée de 4h cause un effet similaire sur l'excitabilité et/ou l'activité synaptique à celui décrit pour la figure 4. La diminution est significative lors de la restriction 10mM > 2.5mM dès 5V (test d'ANOVA à un facteur, $P = 0,007$) et 5mM > 2.5mM dès 6V (test d'ANOVA à un facteur, $P = 0,001$). Cependant, contrairement aux graphiques de la figure 4, on peut parler d'une différence significative entre 10mM et 5mM (à 10V, test d'ANOVA à un facteur, $P = <0,001$) dans ce cas.

Les valeurs sont légèrement inférieures à celles de l'hypoglycémie d'1h30. Cependant, le schéma général des courbes étant le même, il ne semble pas que prolonger l'hypoglycémie de 4h ait un réel effet sur de jeunes souris. Cependant, ce résultat ne signifie pas qu'une hypoglycémie prolongée en termes de jours, semaines...ne modifie pas ces paramètres. Je m'intéresserai à ce point lors des expériences *in vivo*.

La comparaison avec les souris hétérozygotes n'est pas encore disponible.

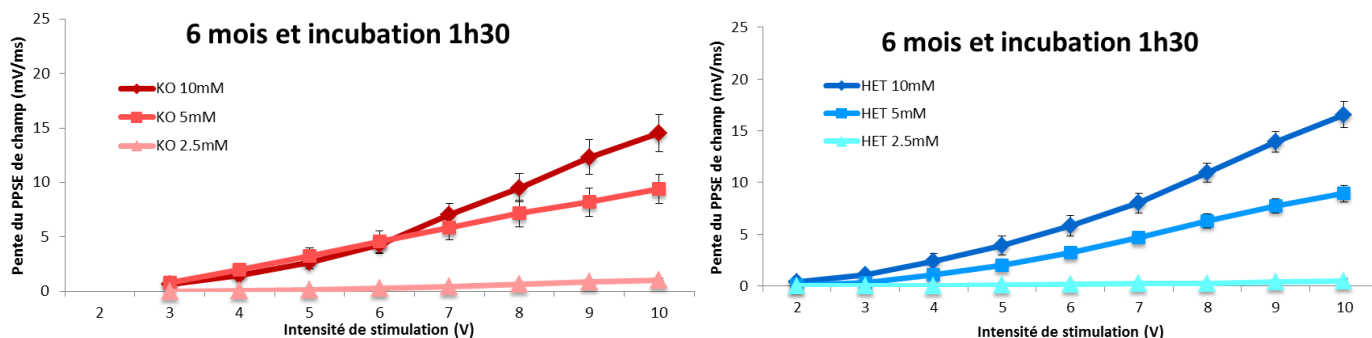


Figure 6. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=10 ; KO 5mM : n=8 ; KO 2.5mM : n=4 ; HET 10mM : n=10 ; HET 5mM : n=9 ; HET 2.5mM : n=6)

La distribution des valeurs pour les souris de 6 mois est similaire à celle des graphiques précédents. Pour les souris $-/-$, la diminution des valeurs est significative lors de la restriction 10mM > 2.5mM dès 5V (test d'ANOVA à un facteur, $P = 0,017$) et 5mM > 2.5mM dès 5V également (test d'ANOVA à un facteur, $P = 0,017$). Comme pour la figure 5, on peut parler d'une différence significative entre 10mM et 5mM à 10V (test d'ANOVA à un facteur, $P = <0,001$).

Pour les souris $+/-$, la diminution des valeurs est significative lors de la restriction 10mM > 2.5mM dès 6V (test d'ANOVA à un facteur, $P = 0,05$) et 5mM > 2.5mM dès 7V (test d'ANOVA à un facteur, $P = <0,001$). Dans ce cas de figure, la différence entre 10mM et 5mM est plus flagrante et devient significative dès 6V.

Aussi, les valeurs des 3 courbes $-/-$ sont plus faibles que celles obtenues pour les souris KO de 6 semaines incubées 1h30 ou 5h30. Un effet de l'âge semble exister et celui-ci réduit plus l'excitabilité et/ou l'activité synaptique que la prolongation de la restriction en glucose.

Pour la concentration la plus faible en glucose, il est à noter que seules les tranches pour lesquelles la réponse postsynaptique était non nulle ont été prises en compte. Ainsi, 5 tranches (sur 9) ont été éliminées des moyennes pour les souris « knockout » et 5 tranches (sur 11) pour les souris hétérozygotes. L'absence de réponse à 2.5mM n'a été observée que pour les souris âgées de 6 mois, indiquant à nouveau un probable effet délétère du vieillissement sur le fonctionnement d'un réseau neuronal.

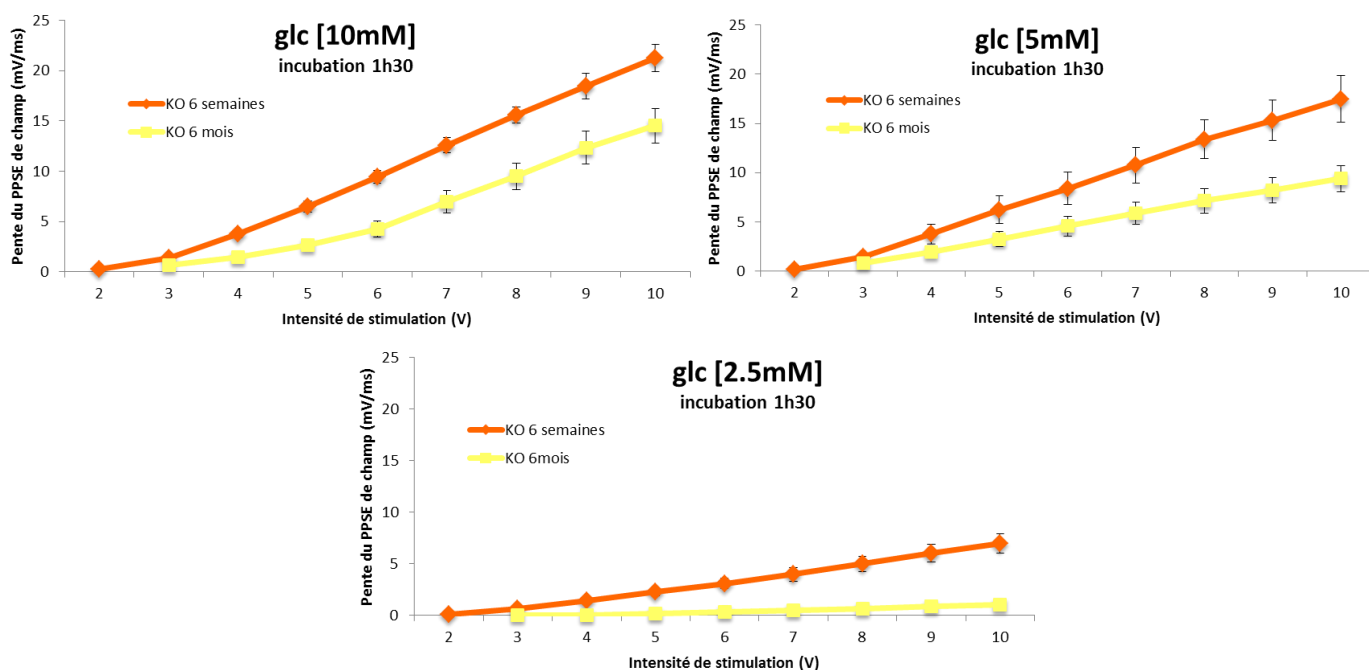


Figure 7. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris $-/-$ de 6 semaines et de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas). (KO 10mM 6 semaines : $n=20$; KO 10mM 6 mois : $n=10$; KO 5mM 6 semaines : $n=14$; KO 5mM 6 mois : $n=8$; KO 2.5mM 6 semaines : $n=17$; KO 2.5mM 6 mois : $n=4$)

L'effet de l'âge sur l'excitabilité et/ou l'activité synaptique est statistiquement prouvé dans cette figure. En effet, une différence significative apparaît entre les 2 courbes et ce, pour chaque concentration. **Le vieillissement réduit les valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique enregistrées sur tranches aiguës d'hippocampes de souris B6.129S7 dépourvues du gène fonctionnel de l'APP.**

Cette diminution chez les souris de 6 mois est significative dès 4V pour 10mM de glucose (test de Mann-Whitney, $P = 0,041$), dès 8V pour 5mM de glucose (t-test, $P = 0,037$) et dès 5V pour 2.5mM de glucose (t-test, $P = 0,019$).

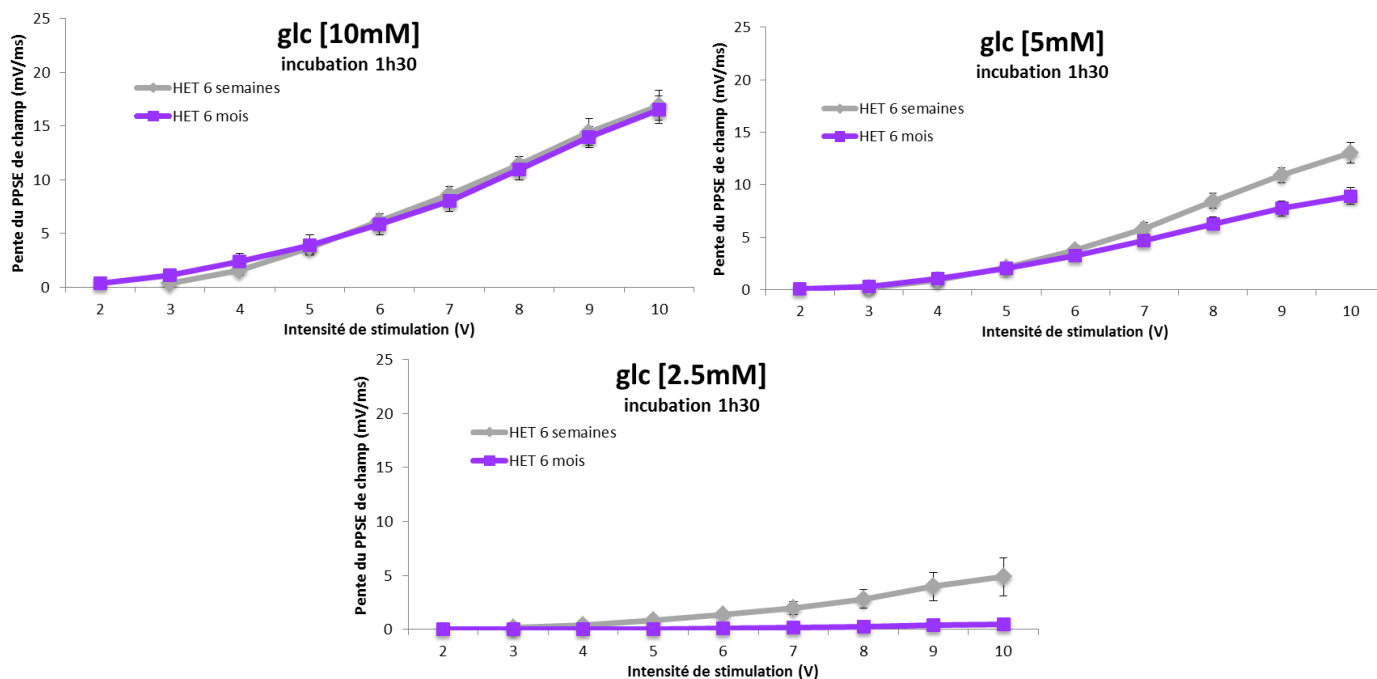


Figure 8. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- de 6 semaines et de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas). (HET 10mM 6 semaines : n=24 ; HET 10mM 6 mois : n=10 ; HET 5mM 6 semaines : n= 23 ; HET 5mM 6 mois : n = 9 ; HET 2.5mM 6 semaines : n= 5 ; KO 2.5mM 6 mois : n= 6)

L'âge semble également influencer sur le bon fonctionnement d'un réseau neuronal chez les souris hétérozygotes mais de manière moindre. En condition non-hypoglycémique, aucune différence d'excitabilité et/ou d'activité n'est visible entre ces deux groupes expérimentaux. Une diminution significative de ces valeurs apparaît à 9V (t-test, $P = 0,018$) pour la concentration intermédiaire et à 7V (t-test, $P = 0,009$) pour la concentration la plus faible.

Le vieillissement réduit également les valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique des souris ne possédant qu'un allèle fonctionnel de l'APP mais de manière moins frappante.

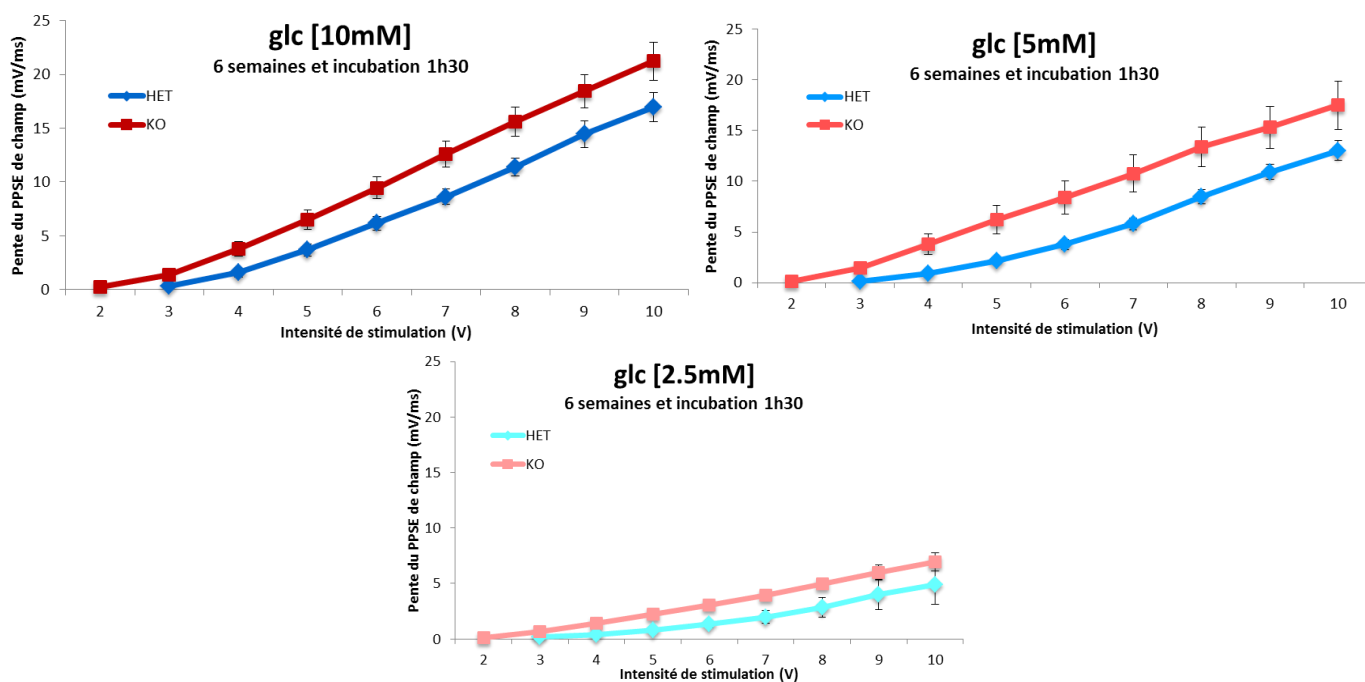


Figure 9. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- et +/- de 6 semaines incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas) (HET 10mM : n=24 ; KO 10mM : n=20 ; HET 5mM : n=23 ; KO 5mM : n=14 ; HET 2.5mM : n=5 ; KO 2.5mM : n=17)

Dans la figure 9, les valeurs des souris déficientes pour l'APP sont toujours supérieures à celles des souris hétérozygotes mais de manière non-significative.

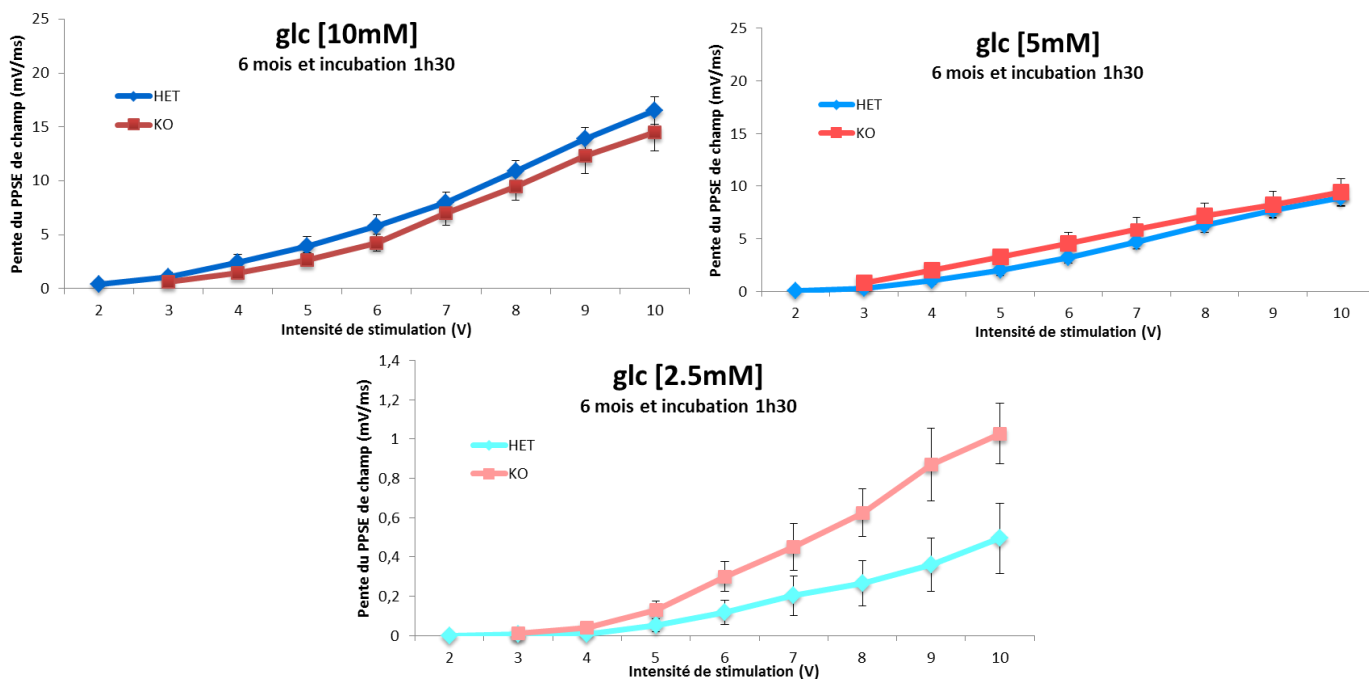


Figure 10. Évolution de la pente du PPSE de champ par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- et -/- de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas) (HET 10mM : n=10 ; KO 10mM : n=10 ; HET 5mM : n=9 ; KO 5mM : n=8 ; HET 2.5mM : n=6 ; KO 2.5mM : n=4)

Comme pour la figure 9, aucune différence significative n'est observable pour les souris de 6 mois. Les résultats des souris sauvages viendront compléter ces informations.

Les résultats repris dans les figures 9 et 10 n'ont pas été observés durant le mémoire, à savoir qu'aucune différence significative n'apparaissait entre les +/- et les -/- mais la tendance était inversée entre les 2 génotypes. Cette divergence peut cependant être expliquée. En effet, à l'époque, l'âge ne constituait pas un facteur limitant pour la constitution des groupes. Les souris utilisées étaient âgées de plusieurs mois. De plus, d'autres paramètres comme la température d'incubation et les concentrations en glucose utilisées ont également été modifiés depuis.

Comme cité précédemment, les valeurs des volées afférentes ont été enregistrées afin de quantifier uniquement l'excitabilité de la population de neurones stimulés. L'excitabilité est la caractéristique fonctionnelle principale du neurone. Sa mesure témoigne donc du bon fonctionnement de ces cellules.

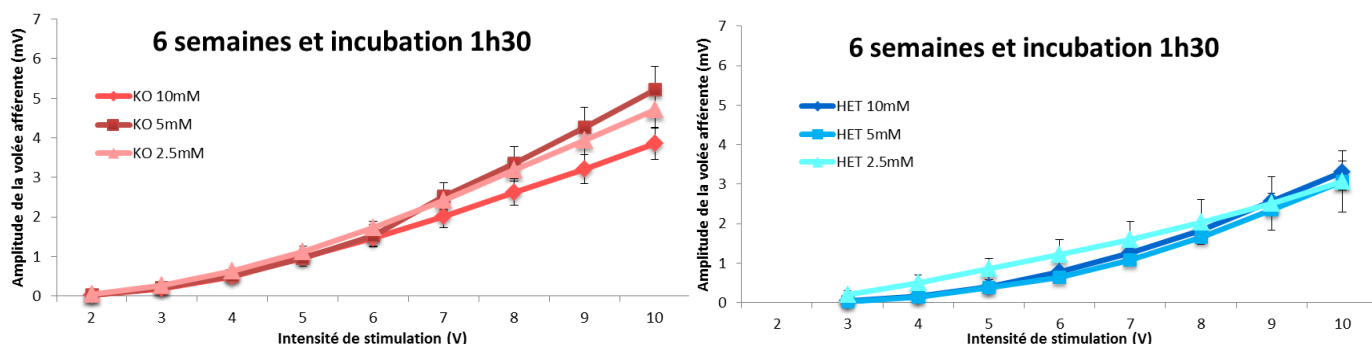


Figure 11. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- (gauche) et +/- (droite) de 6 semaines incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=20 ; KO 5mM : n=14 ; KO 2.5mM : n=17 ; HET 10mM : n=24 ; HET 5mM : n=23 ; HET 2.5mM : n=5)

La distribution des valeurs d'amplitude de la volée afférente ne suit pas la distribution des valeurs de pente du PPSE de champ. En effet, la volée afférente ne diminue pas avec la restriction en glucose. Pour les deux graphiques, les mesures d'excitabilité aux différentes concentrations en glucose sont statistiquement similaires pour les différentes intensités de stimulation.

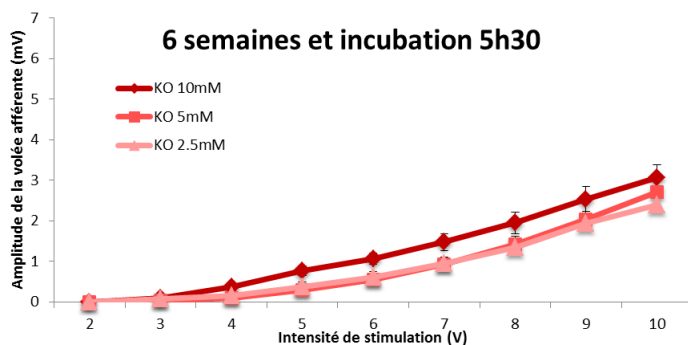


Figure 12. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris -/- de 6 semaines incubées 5h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=12 ; KO 5mM : n=8 ; KO 2.5mM : n=7)

De même, lorsque l'hypoglycémie est prolongée de 4h, l'excitabilité aux différentes concentrations en glucose reste similaire. Cependant, pour chaque concentration, celle-ci est inférieure à celles tranches -/- présentées dans la figure 11 mais de manière non significative.

Une hypoglycémie encore prolongée d'au minimum plusieurs heures pourrait aboutir à un résultat significatif. Toutefois, cela serait difficile à mettre en place sur le modèle de tranche aigue et ce, surtout pour une incubation à 32°C car la mort progressive des tranches viendrait biaiser l'expérience.

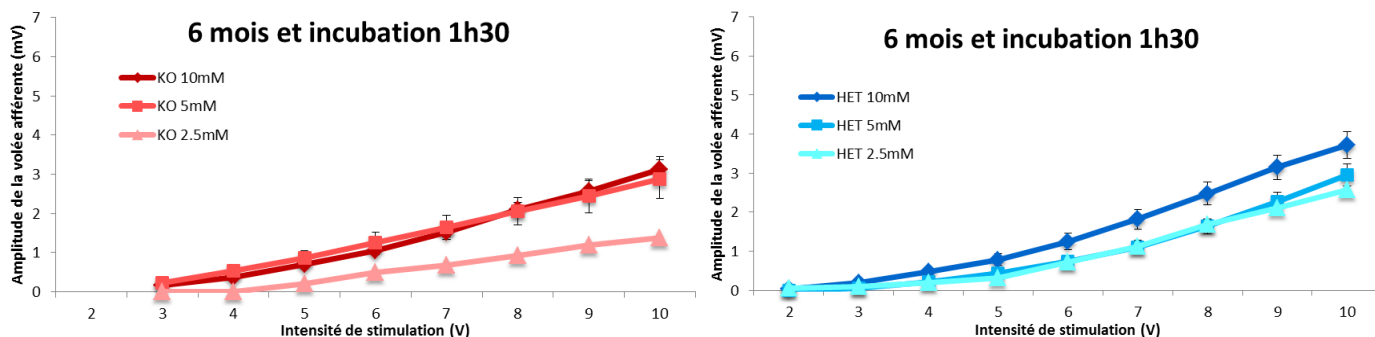


Figure 13. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris -/- de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=10 ; KO 5mM : n=8 ; KO 2.5mM : n=4 ; HET 10mM : n=10 ; HET 5mM : n=9 ; HET 2.5mM : n=3)

Pour les souris « knockout » âgées de 6 mois, une diminution significative d'excitabilité est présente pour la concentration la plus faible en glucose par rapport aux deux autres concentrations utilisées (dès 7V ; ANOVA à un facteur, $P = 0,048$). Les souris hétérozygotes ne présentent aucune différence significative d'excitabilité, comme dans le cas des souris jeunes.

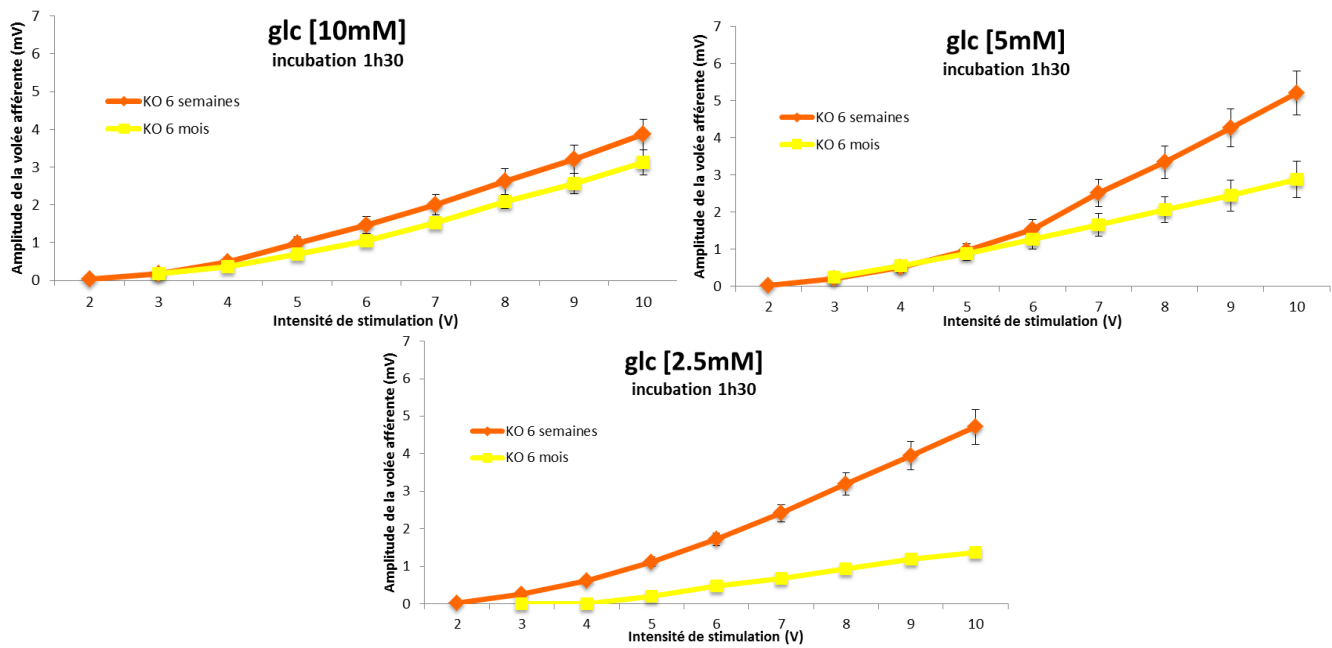


Figure 14. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- de 6 semaines et de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas). (KO 10mM 6 semaines : n=20 ; KO 10mM 6 mois : n=10 ; KO 5mM 6 semaines : n= 14 ; KO 5mM 6 mois : n= 8 ; KO 2.5mM 6 semaines : n= 17 ; KO 2.5mM 6 mois : n= 4)

Une comparaison de l'excitabilité des tranches dépourvues en APP en fonction de l'âge auquel la souris a été sacrifiée indique une diminution de l'excitabilité liée à l'âge mais de manière dépendante à la concentration en glucose utilisée dans le LCRa. En effet, l'excitabilité basale reste la même chez les souris jeunes et chez les souris plus âgées en condition non-hypoglycémique alors qu'une diminution significative apparaît chez les souris de 6 mois dans les 2 concentrations hypoglycémiques. L'excitabilité est significativement réduite chez les souris de 6 mois dès une stimulation de 8V à 5mM de glucose (t-test, $P = 0,032$) et dès une stimulation de 5V à 2.5mM de glucose (test de Mann-Whitney, $P = 0,003$). **Les souris « knockout » « âgées » semblent donc moins tolérantes à une hypoglycémie de l'hippocampe que les souris jeunes.**

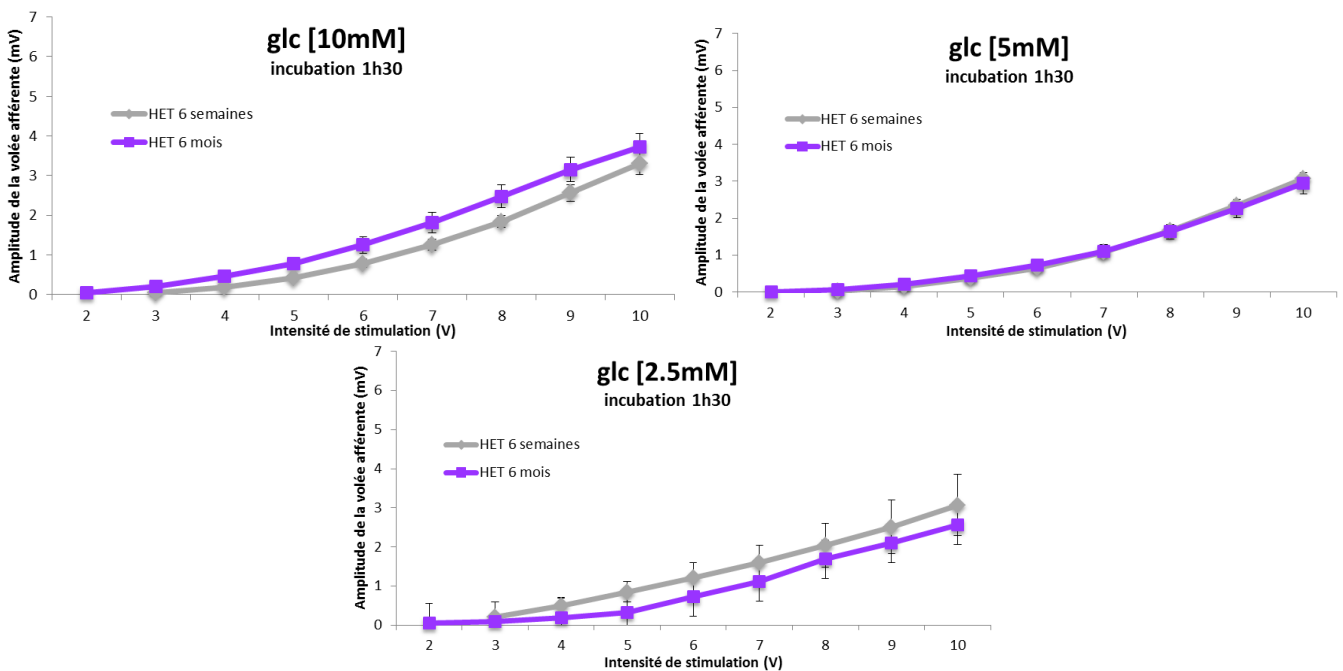


Figure 15. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- de 6 semaines et de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas). (HET 10mM 6 semaines : n=24 ; HET 10mM 6 mois : n=10 ; HET 5mM 6 semaines : n= 23 ; HET 5mM 6 mois : n= 9 ; HET 2.5mM 6 semaines : n= 5 ; KO 2.5mM 6 mois : n= 3)

Aucune différence significative d'excitabilité n'est observable lors de la comparaison des souris hétérozygotes jeunes et de celles plus âgées. **La présence d'un des deux allèles de l'APP semble donc prévenir la dégradation de l'excitabilité liée à l'âge.**

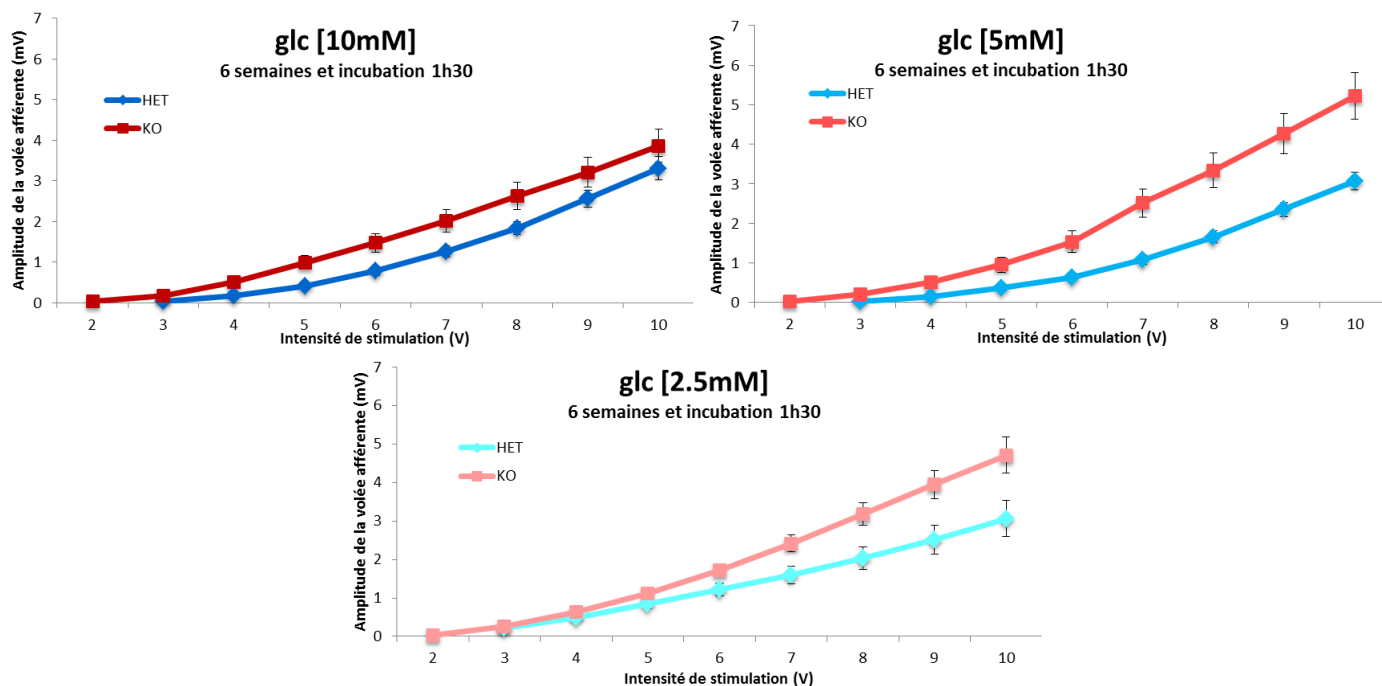


Figure 16. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- et -/- de 6 semaines incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas) (HET 10mM : n=24 ; KO 10mM : n=20 ; HET 5mM : n=23 ; KO 5mM : n=14 ; HET 2.5mM : n=5 ; KO 2.5mM : n=17)

Comme pour la figure 9, l'amplitude de la volée afférente a tendance, pour les 3 graphiques, à être supérieure chez les souris -/-.

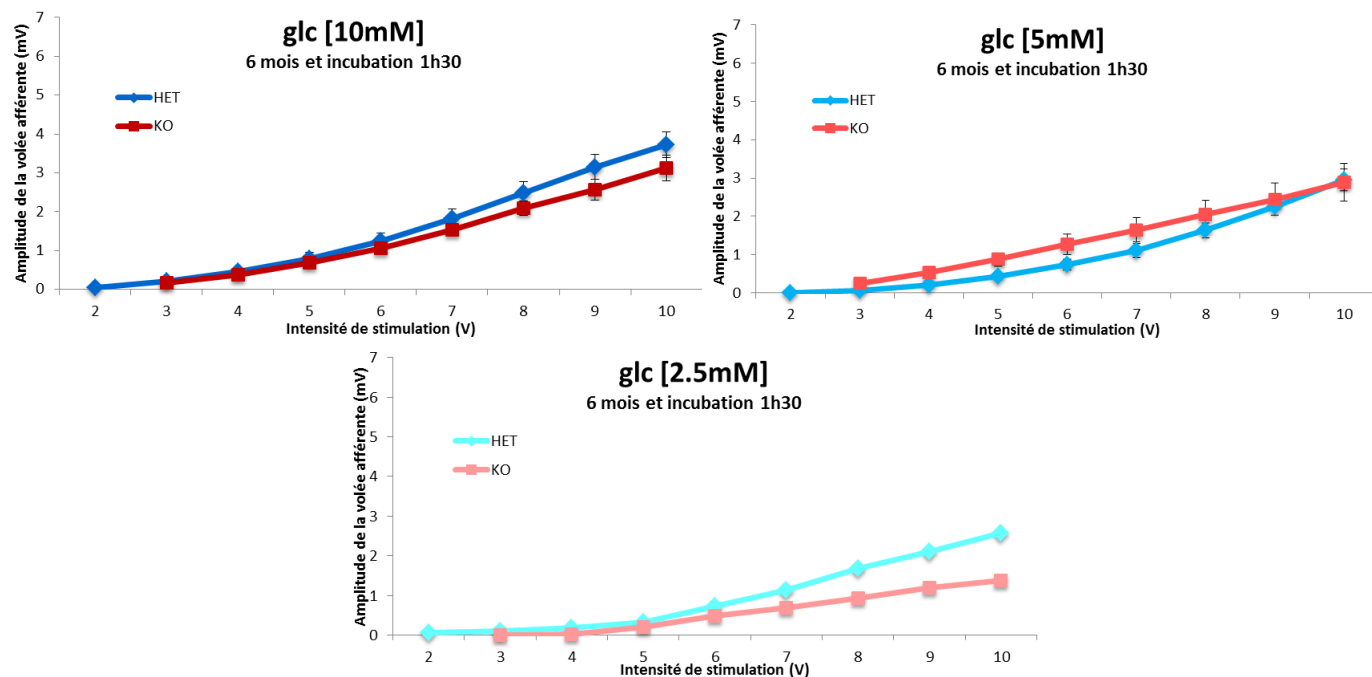


Figure 17. Évolution de l'amplitude de la volée afférente par rapport à l'intensité de stimulation pour des tranches d'hippocampes de souris +/- et -/- de 6 mois incubées 1h30 dans du LCRa contenant 10mM (haut, gauche), 5mM (haut, droite) ou 2.5mM de glucose (bas) (HET 10mM : n=10 ; KO 10mM : n=10 ; HET 5mM : n=9 ; KO 5mM : n=8 ; HET 2.5mM : n=3 ; KO 2.5mM : n=4)

Comme dans le cas de la figure 10, aucune différence significative n'est observable pour les souris de 6 mois.

Puisque l'enregistrement du PPSE de champ témoigne à la fois de l'excitabilité neuronale et de l'activité synaptique et que la volée afférente indique exclusivement l'excitabilité, le rapport entre ces deux paramètres est un indicateur du fonctionnement de la synapse.

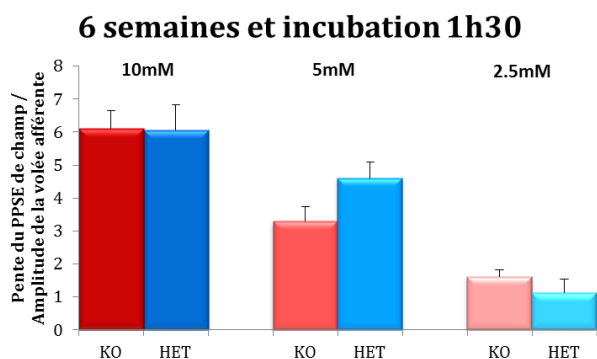


Figure 18. Rapports entre la pente du PPSE de champ et l'amplitude de la volée afférente à une intensité de stimulation de 10V pour des tranches d'hippocampes de souris -/- (rouge) et +/- (bleu) de 6 semaines incubées 1h30 dans du LCra contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=20 ; HET 10mM : n=24 ; KO 5mM : n=14 ; HET 5mM : n=23 ; KO 2.5mM : n=17 ; HET 2.5mM : n=4)

Les synapses des tranches d'hippocampes provenant de souris jeunes et incubées dans les 3 LCra fonctionnent statistiquement de manière égale pour les deux génotypes. Ceci correspond aux résultats précédents où l'on observait déjà que les 2 paramètres avaient tendance à être supérieurs chez les souris « knockout » et inférieurs chez les souris hétérozygotes. Les rapports sont donc similaires.

Pour un même génotype, des différences significatives apparaissent. En effet, **la force de la dépolarisation post-synaptique dépend de la concentration en glucose** tandis que l'excitabilité des souris jeunes se maintient dans les conditions d'hypoglycémie testées.

Ainsi, le rapport des tranches +/- est significativement inférieur lors du passage de 10mM à 2.5mM de glucose ainsi que de 5mM à 2.5mM mais il ne s'agit que d'une tendance lors du passage de 10mM à 5mM, comme dans le cas de la figure 4 (test de Kruskal-Wallis, P=0,003).

Le résultat est le même pour les souris -/- à part que la réduction est également significative lors du passage à l'hypoglycémie modérée (test de Kruskal-Wallis, P = <0,001).

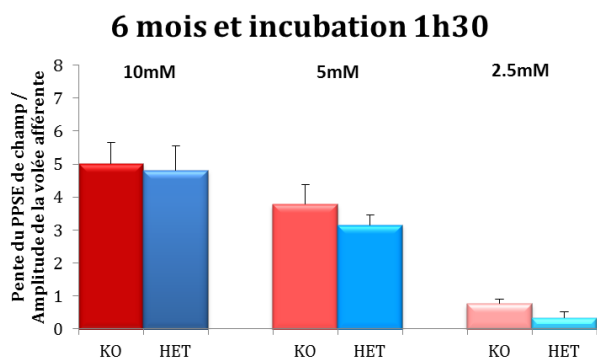


Figure 19. Rapports entre la pente du PPSE de champ et l'amplitude de la volée afférente à une intensité de stimulation de 10V pour des tranches d'hippocampes de souris -/- (rouge) et +/- (bleu) de 6 mois incubées 1h30 dans du LCra contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n=10 ; HET 10mM : n=10 ; KO 5mM : n=8 ; HET 5mM : n=9 ; KO 2.5mM : n=4 ; HET 2.5mM : n=3)

Pour la figure 19, le rapport des tranches -/- est significativement inférieur lors du passage de 10mM à 2.5mM de glucose ainsi que de 5mM à 2.5mM mais il ne s'agit que d'une tendance lors du passage de 10mM à 5mM (test d'ANOVA à un facteur, P=0,002).

Pour les souris hétérozygotes, la différence n'est significative que lors du passage 10mM à 2.5mM (test de Kruskal-Wallis, P = 0,004). Cependant, le nombre d'expériences n'est pas suffisant que pour tirer des conclusions définitives sur l'absence de significativité.

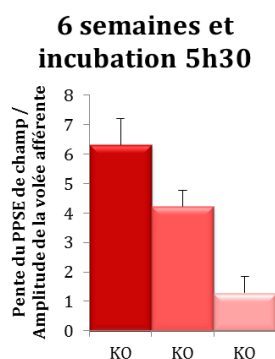


Figure 20. Rapports entre la pente du PPSE de champ et l'amplitude de la volée afférente à une intensité de stimulation de 10V pour des tranches d'hippocampes de souris -/- de 6 semaines incubées 5h30 dans du LCra contenant 10mM, 5mM ou 2.5mM de glucose. (KO 10mM : n= 12 ; KO 5mM : n=8 ; KO 2.5mM : n=6)

La différence statistique des tranches -/- incubées dans des conditions hypoglycémiques pendant 5h30 n'apparaît que lors du passage de la condition normoglycémique à la condition d'hypoglycémie sévère (test de Kruskal-Wallis, P = 0,002). A nouveau, les groupes expérimentaux doivent être complétés afin de déterminer si les tendances sont significatives ou non.

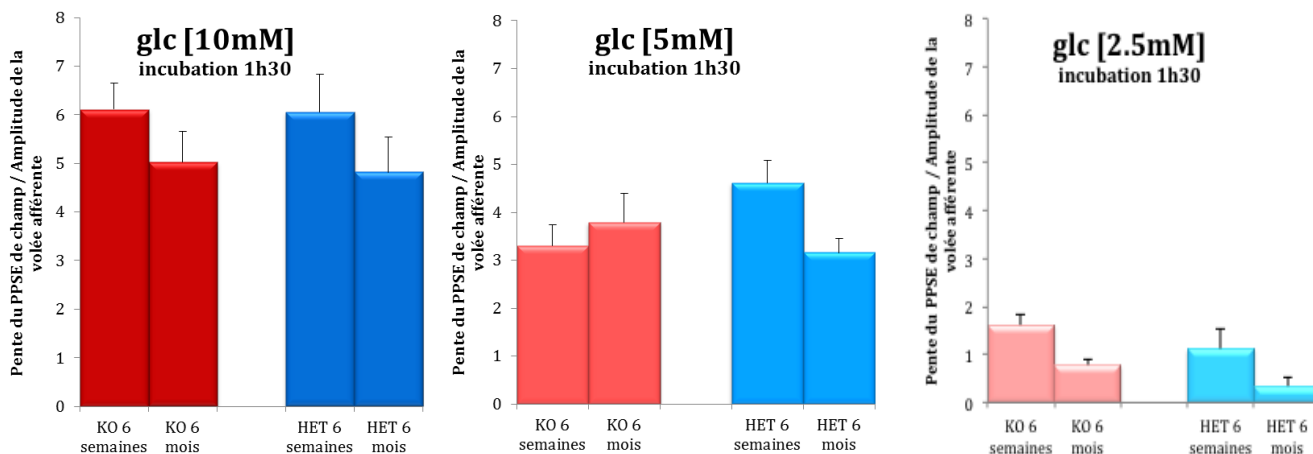


Figure 21. Rapports entre la pente du PPSE de champ et l'amplitude de la volée afférente à une intensité de stimulation de 10V pour des tranches d'hippocampes de souris -/- (rouge) et +/- (bleu) de 6 semaines et de 6 mois incubées 1h30 dans du LCra contenant 10mM (gauche), 5mM (milieu) ou 2.5mM de glucose (droite). (KO 10mM 6 semaines : n=20 ; KO 10mM 6 mois : n=10 ; HET 10mM 6 semaines : n=24 ; HET 10mM 6 mois : n=10 ; KO 5mM 6 semaines : n=14 ; KO 5mM 6 mois : n=8 ; HET 5mM 6 semaines : n=23 ; HET 5mM 6 mois : n=9 ; KO 2.5mM 6 semaines : n=3 ; KO 2.5mM 6 mois : n=4 ; HET 2.5mM 6 semaines : n=4 ; HET 2.5mM 6 mois : n=17)

Lorsque l'on compare les souris de 6 semaines et celles de 6 mois dans les 6 groupes représentés dans la figure 21, le rapport n'est jamais statistiquement différent mais la tendance est majoritairement la même.

En conclusion, ces résultats indiquent que le PPSE de champ et donc l'excitabilité et/ou l'activité synaptique du réseau neuronal diminue lorsque la concentration en glucose diminue. L'analyse des

volées afférentes permet de suggérer que l'hypoglycémie affecte plus la transmission synaptique que l'excitabilité. Ainsi, dans les conditions hypoglycémiques testées, les potentiels d'action sont toujours générés, les neurotransmetteurs libérés mais la dépolarisation postmembranaire est plus faible.

Ensuite, le vieillissement est lui-même un facteur qui modifie ces deux paramètres.

De ce fait, les groupes expérimentaux de souris de 6 semaines et de 6 mois seront gardés pour la suite de ce projet.

De plus, l'APP ou l'un de ses dérivés semble impliqué dans le bon fonctionnement neuronal lors du vieillissement puisque les souris de 6 mois dépourvues du gène fonctionnel de l'APP présentaient des valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique réduites en comparaison des souris jeunes et cette réduction était plus marquée que chez les souris possédant un des deux allèles de l'APP. Ces dernières présentaient des valeurs d'excitabilité et/ou d'activité synaptique réduites. Les résultats provenant des souris sauvages devraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

3.6. Métabonomique

Au sein du service de toxicologie et de biologie humaine de l'UMONS, la métabonomique est classiquement réservée à l'analyse de l'urine et du sérum de rat soumis à diverses drogues. Dans mon cas, il a tout d'abord fallu s'assurer que la technique d'extraction chloroforme/méthanol/eau (CME) sur hippocampe et au départ d'une souris était fonctionnelle. Ceci fût vérifié sur un groupe de 8 souris et les résultats préalablement obtenus sont prometteurs. Le nombre statistique suffisant n'est cependant pas encore atteint que pour tirer des conclusions sur les spectres RMN obtenus.

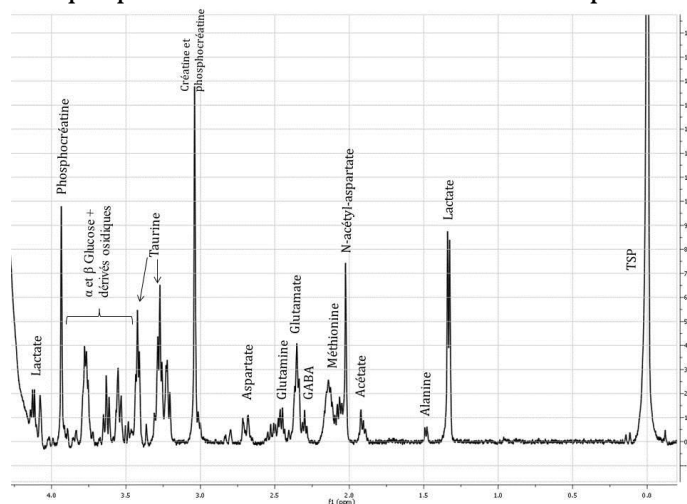


Figure 22. Spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H) provenant de tranches aigues d'hippocampes de souris B6.129S7 hétérozygotes pour le gène de l'APP obtenu par extraction CEM.

4. PERSPECTIVES ET CALENDRIER MENSUEL POUR L'ANNEE 2014-2015

La première chose à faire est d'effectuer des accouplements de souris sauvages afin de compléter rapidement les courbes d'« input-output ». La longue période d'incubation sur les souris de 6 mois sera également expérimentée dès la fin du mois et les groupes expérimentaux pour lesquels le nombre statistique n'est pas atteint seront complétés.

En parallèle, l'anticorps anti-APP de la firme Millipore sera à nouveau testé en apportant les modifications de protocole nécessaires. De nombreuses tranches d'hippocampes provenant des divers groupes expérimentaux et d'hippocampes entiers ont été congelées en vue de cette utilisation. Le matériel sauvage sera rapidement disponible. De même, je tenterai d'obtenir des résultats pour l'anticorps reconnaissant spécifiquement les isoformes à domaine KPI.

Une méthode d'extraction spécifique (tripure) permettra d'extraire à la fois les protéines et les ARN d'un même échantillon. De ce fait, le même matériel assurera la réalisation des RT q-PCR.

Une fois la section « Détermination de l'expression des isoformes de l'APP pour les différents génotypes et conditions expérimentales » clôturée, je poursuivrai les expériences de résonance magnétique nucléaire, toujours au départ du stock de tranches et d'hippocampes prêt à utilisation.

Par la suite, de nouvelles portées seront disponibles pour tester les différentes drogues pharmacologiques en électrophysiologie. La technique de patch clamp sur tranches est en train d'être mise en place dans le laboratoire. Elle sera utilisée dans 1 an pour étudier le fonctionnement des pompes Na⁺/K⁺ ATPase et canaux K⁺ ATP dépendants dans mes différentes conditions expérimentales.

Certaines expériences se chevauchent pour la simple raison que les expériences nécessitant du matériel frais seront effectuées en fonction de la naissance de nouvelles portées. Les manipulations utilisant le matériel congelé combleront l'attente d'échantillons frais.

Le temps nécessaire pour terminer la section « Détermination de l'expression des isoformes de l'APP pour les différents génotypes et conditions expérimentales » est revu à la hausse de sorte à prendre en compte le temps nécessaire à la commande et à l'essai d'un éventuel nouvel anticorps ou la construction d'une nouvelle paire d'amorces si cela s'avère nécessaire.

	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 aigues 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'hippocampes)												
Signature métabonomique par RMN du proton												
Détermination de l'excitabilité synaptique par mesures électrophysiologiques (tranches aigues d'hippocampes)												
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												

Les perspectives d'applications industrielles n'ont pas changé. Le but de ce projet est toujours d'améliorer les connaissances sur le rôle de l'APP dans le métabolisme du glucose afin d'un jour élaborer un médicament capable d'annihiler l'évolution de la maladie d'Alzheimer avant que le patient présente les premiers symptômes cliniques.