

|                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| Nom et prénom du proposant    | Gloire Mélanie |
| Numéro de référence SEMAPHORE | 26325085       |

## PARTIE SCIENTIFIQUE DU PROJET

LANGUE PRINCIPALE CHOISIE = FRANÇAIS

Cette partie comprend les éléments suivants :

1. Rapport d'activités sur la 1<sup>re</sup> bourse FRIA
2. Projet de recherches pour la 2<sup>nde</sup> bourse
3. Commentaires additionnels (optionnel)

**Le candidat doit compléter les rubriques ci-dessous et convertir le fichier au format PDF (non protégé) avant de l'annexer à son dossier de candidature électronique.**

**Le candidat doit veiller à respecter les consignes relatives au format du document et les limites de pages spécifiées.**

### **1. RAPPORT D'ACTIVITÉS SUR LA 1<sup>RE</sup> BOURSE FRIA**

#### 1.1. Enregistrements électrophysiologiques

##### 1.1.1. Paradigme expérimental

Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés sur des tranches aiguës d'hippocampe de souris APP<sup>+/+</sup> (WT), APP<sup>+/-</sup> (HT) et APP<sup>-/-</sup> (KO) âgées de 6 semaines ou de 6 mois. La déprivation en glucose (DG) est obtenue en réduisant la concentration en glucose dans le liquide céphalorachidien artificiel (LCRa) dans lequel les tranches sont incubées (Figure 1a). Chaque tranche d'hippocampe n'est exposée qu'à une concentration en glucose. La comparaison des conditions s'effectue donc au départ de souris différentes. L'activité du réseau neuronal (PPSE de champ et volées afférentes) est enregistrée au niveau de la région CA1 de l'hippocampe par stimulation des collatérales de Schaffer et réception dans le *stratum radiatum* (Figure 1b). Les PPSE de champ et les volées afférentes (VA) sont obtenus par enregistrement de l'« input-output ». Ce dernier correspond à la courbe de croissance de l'excitabilité (VA) et de la dépolarisation postsynaptique (PPSE) d'une population de neurones. L'amplitude croissante de stimulation (2V-10V par paliers de 1V) permet la stimulation d'un nombre croissant de fibres axonales et donc l'esquisse de la courbe.

##### 1.1.2. Note sur les volées afférentes et les tests statistiques

Les résultats des volées afférentes ne sont pas présentés car aucune différence notable d'excitabilité n'est observée pour les divers génotypes. Cependant, à ce stade du projet, il est possible de conclure que l'excitabilité est le paramètre se maintenant le mieux lors d'une restriction en glucose. En effet, la VA est encore présente même lorsque la dépolarisation postsynaptique est absente. Enfin, il est également possible de conclure que, puisque le passage des potentiels d'action n'est pas modifié selon le génotype, les différences sont dues à une modification de la fonction synaptique elle-même due à l'APP. L'APP régule donc la transmission synaptique.

Les tests statistiques réalisés sont le test de Kruskal-Wallis et le test U de Mann-Whitney car certains groupes ne présentaient pas une distribution normale de la moyenne et aussi le test du Chi<sup>2</sup>. Le seuil  $\alpha$  de significativité a été fixé à  $p \leq 0.05$ .

### 1.1.3. Effet de la déprivation en glucose

Lors d'une diminution de l'apport en glucose, la **dépolarisation postsynaptique** de la population de neurones stimulés **se réduit et ce, d'autant plus que la déprivation est forte** (Figure 2a). Cette diminution est observée pour les 3 génotypes et aux 2 âges testés (6 semaines, WT, HT et KO : 10mM > 2.5mM : \* ; 5mM > 2.5mM : \* ; 10mM > 5mM : ns ; 6 mois WT : 10mM > 2.5mM : \* ; 10mM > 5 mM : \* ; 5mM > 2.5mM : ns ; 6 mois HT : toujours \* ; KO 6 mois : 10mM > 2.5mM : \* ; 5mM > 2.5mM : \* ; 10mM > 5mM : ns).

### 1.1.4. Effet du génotype

**A 10mM de glucose, les pentes des PPSE de champ ne sont pas différentes pour les différents génotypes.** Cependant, afin de diminuer au maximum la variabilité expérimentale, les expériences sont regroupées dans le temps et les résultats sont présentés sous la forme d'une diminution relative du PPSE pour chaque génotype et chaque concentration en glucose. Pour chaque génotype, la pente moyenne (mV/ms) à la stimulation maximale (10V) et pour la condition 10mM de glucose est fixée à 100%. Les valeurs de pentes des autres conditions sont donc un pourcentage de cette dernière.

**Des différences de tolérance face à la restriction en glucose apparaissent au sein des différents génotypes** (Figure 2b). En effet, la diminution du PPSE de champ lors du passage de 10mM à 5mM est plus importante chez les WT, puis chez les HT mais l'est moins chez les KO. Cette distribution est retrouvée pour les 2 âges testés. Néanmoins, les chutes lors des différentes restrictions réalisées sont plus marquées chez les souris les plus âgées, indiquant déjà un effet de l'âge sur l'activité synaptique (6 semaines 5mM : WT \* < KO ; 6 semaines 2.5mM : WT \* < KO ; WT \* < HT ; 6 mois 5mM : WT \* < KO ; WT \* < HT ; 6 mois 2.5mM : ns car la dépolarisation postsynaptique est extrêmement réduite pour cet âge et cette concentration en glucose).

**Les souris sauvages semblent donc être les plus sensibles face à la réduction de l'apport en glucose. L'APP pourrait donc posséder une rôle dans la régulation du métabolisme du glucose et/ou dans le renouvellement des neuromédiateurs.**

### 1.1.5. Effet de l'âge

Pour rappel, deux âges ont été testés car la littérature suggère que les déficits phénotypiques des souris « knockout » apparaissent après 14 semaines.

Les résultats obtenus en comparant ces deux âges indiquent que **le vieillissement réduit l'activité synaptique d'un réseau neuronal.** En effet, pour une concentration de 10mM de glucose, la courbe de l' « input-output » des souris de 6 mois est toujours inférieure à celle des souris de 6 semaines et ceci, de manière significative chez les souris KO tandis qu'il ne s'agit que d'une tendance chez les deux autres groupes (Figure 3a).

Ensuite, **le vieillissement semble diminuer la tolérance d'un réseau neuronal à une diminution de l'apport en glucose.** En effet, l'écart entre la courbe 6 semaines et la courbe 6 mois s'accroît avec la diminution en glucose et est toujours significatif. En moyenne, la diminution est de 21,94% à 10mM, de 44,46% à 5mM et de 72,54% à 2.5mM. Cependant, le pourcentage de diminution ne peut pas être comparé statistiquement entre les génotypes. Il n'est donc **pas évident**, par enregistrements électrophysiologiques, **de tirer une conclusion sur le rôle éventuel de l'APP sur le vieillissement** (Figure 3b).

### 1.1.6. Effet d'un antagoniste des récepteurs GABA de type A : Picrotoxine

Quelques études suggèrent que les souris APP « knockout » sont sensibles aux crises d'épilepsie. Les récepteurs GABA-A ont été totalement inhibés par l'ajout de picrotoxine (PTX) 100µM afin de mesurer l'impact de la désinhibition sur l'activité du réseau (Figure 4a).

**La PTX**, ajoutée dans le LCRa dès le repos succédant à la dissection des tranches, **a une influence sur la pente du PPSE de champ**. Cette dernière est significativement diminuée lors de l'ajout de la drogue chez les souris WT mais augmentée chez les souris KO. La pente du PPSE des souris HT est également significativement supérieure à celle des souris WT et inférieure à celle des souris KO. Les HT se retrouvent donc à nouveau entre les deux autres génotypes (Figure 4b).

La PTX déclenche l'apparition de PPSE polyphasiques et permet la mesure d'un nouveau paramètre témoignant de l'intensité de l'épilepsie déclenchée : la coastline. Celle-ci est la mesure de la modification de direction verticale (mV).

Pour les concentrations de 10mM et 5mM, **l'épilepsie est significativement supérieure chez les souris KO** en comparaison avec les WT et les HT qui, elles, ne sont pas différentes entre elles (Figure 4c). Pour la concentration de 2.5mM de glucose, le type de PPSE a été quantifié plutôt que l'intensité d'épilepsie car l'ajout de la drogue en plus d'un faible apport en glucose rend la mesure de la « coastline » impossible dans certains cas. Les 3 catégories sont les suivantes : absence de PPSE, PPSE monophasique et PPSE polyphasique. De cette façon, le test du Chi<sup>2</sup> indique des différences significatives entre les groupes. Le test a été réalisé en comparant les groupes 2 à 2 et on peut alors conclure que les souris WT présentent significativement moins de PPSE polyphasiques par rapport aux HT et aux KO et aussi que le pourcentage d'absence de PPSE est significativement plus élevé chez ces souris. Les souris KO et HT ne sont pas différentes à ce niveau (Figure 4d).

Puisque les souris KO permettent d'enregistrer des « coastlines » même en déprivation de glucose sévère, l'intensité d'épilepsie a été comparée pour les différentes concentrations en glucose. On observe alors une diminution de l'intensité de l'épilepsie avec la diminution du glucose et ces diminutions sont significatives pour le passage de 10mM à 5mM et à 2.5mM mais pas de 5 à 2.5mM, bien que la tendance soit marquée (Résultat non présenté).

L'ajout de la PTX n'influence pas les VA.

**L'inhibition des récepteurs GABA de type A induit un effet opposé sur la transmission synaptique en fonction du niveau auquel l'APP est exprimé.** La corrélation entre l'activité du GABA et le niveau d'APP sera étudiée plus en détail dans la suite du projet.

## 1.2. Métabonomique

### 1.2.1. Paradigme expérimental

Le principe de l'expérience est le suivant. Les hippocampes sont disséqués dans du LCRa ne contenant pas de glucose, dissociés mécaniquement et les métabolites sont extraits grâce à la méthode d'extraction méthanol-chloroforme (M/C, 4°C). La phase aqueuse est évaporée au speedvac et les métabolites sont resuspendus dans un tampon phosphate (100% D<sub>2</sub>O) contenant le composé de référence qui résonne à la valeur fixe de 0ppm : le TSP (triméthylsilyl propanoic acid). Les échantillons sont analysés par un spectromètre RMN du proton de 500MHz. La transformée de Fourier transforme chaque fréquence de résonance en un déplacement chimique (ppm) et permet donc la lecture d'un spectre. Ces spectres sont découpés et analysés par analyse en composantes principales (PCA) ou par régression des moindres carrés partiels (PLS). Les « loadings plot » et « scores plot » permettent l'identification des variations d'expression de chaque métabolite.

### 1.2.2. Profils métaboliques

La métabonomique a permis de mettre en évidence le fait que **les souris exprimant différents niveaux d'APP peuvent être discriminées sur base de leur profil métabolique**. Les variations métaboliques les plus intéressantes à ce stade du projet sont une **diminution du taux de glucose chez les souris KO** ainsi qu'une diminution de la quantité de créatine/phosphocréatine. A l'inverse, **le GABA est augmenté chez ces souris KO**. A nouveau, on observe que le profil métabolique des hétérozygotes est intermédiaire à celui des 2 autres groupes expérimentaux (Figure 5). Ces résultats sont en cours et seront approfondis dans la suite du projet.

### 1.3. Figures



Figure 1. Paradigme expérimental des enregistrements électrophysiologiques. a) L'hippocampe est débité en tranches et les tranches sont incubées dans du LCRa chauffé à 32°C et oxygéné. Celui-ci peut contenir 3 concentrations en glucose : 10mM (contrôle), 5mM (DG douce) ou 2.5mM (DG sévère). b) Schéma du placement des électrodes de stimulation (S1 et S2) et de réception (Rec) dans la région CA1 de l'hippocampe.

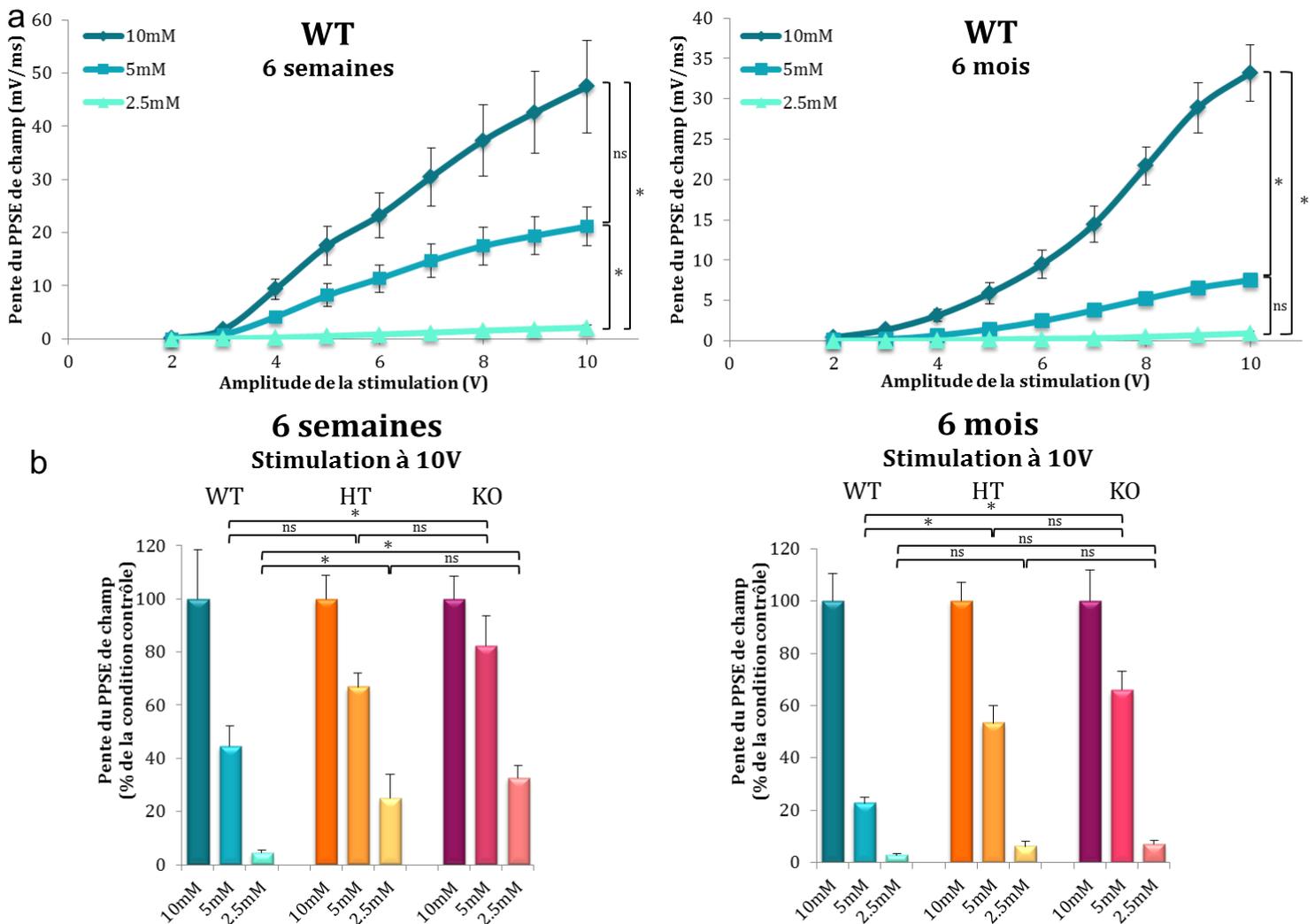


Figure 2. La déprivation en glucose réduit la transmission synaptique de la région CA1 de l'hippocampe pour les souris de 6 semaines et de 6 mois. Cette réduction dépend de la concentration en glucose (a, exemple sur les WT) et du niveau d'expression de l'APP (b). n (tranches) = WT 10mM 6 semaines : 9 ; WT 5mM 6 semaines : 10 ; WT 2.5mM 6 semaines : 11 ; WT 10mM 6 mois : 12 ; WT 5mM 6 mois : 10 ; WT 2.5mM 6 mois : 10 ; HT 10mM 6 semaines : 21 ; HT 5mM 6 semaines : 23 ; HT 2.5mM 6 semaines : 6 ; HT 10mM 6 mois : 15 ; HT 5mM 6 mois : 18 ; HT 2.5mM 6 mois : 15 ; KO 10mM 6 semaines : 20 ; KO 5mM 6 semaines : 14 ; KO 2.5mM 6 semaines : 14 ; KO 10mM 6 mois : 10 ; KO 5mM 6 mois : 10 ; KO 2.5mM 6 mois : 7.

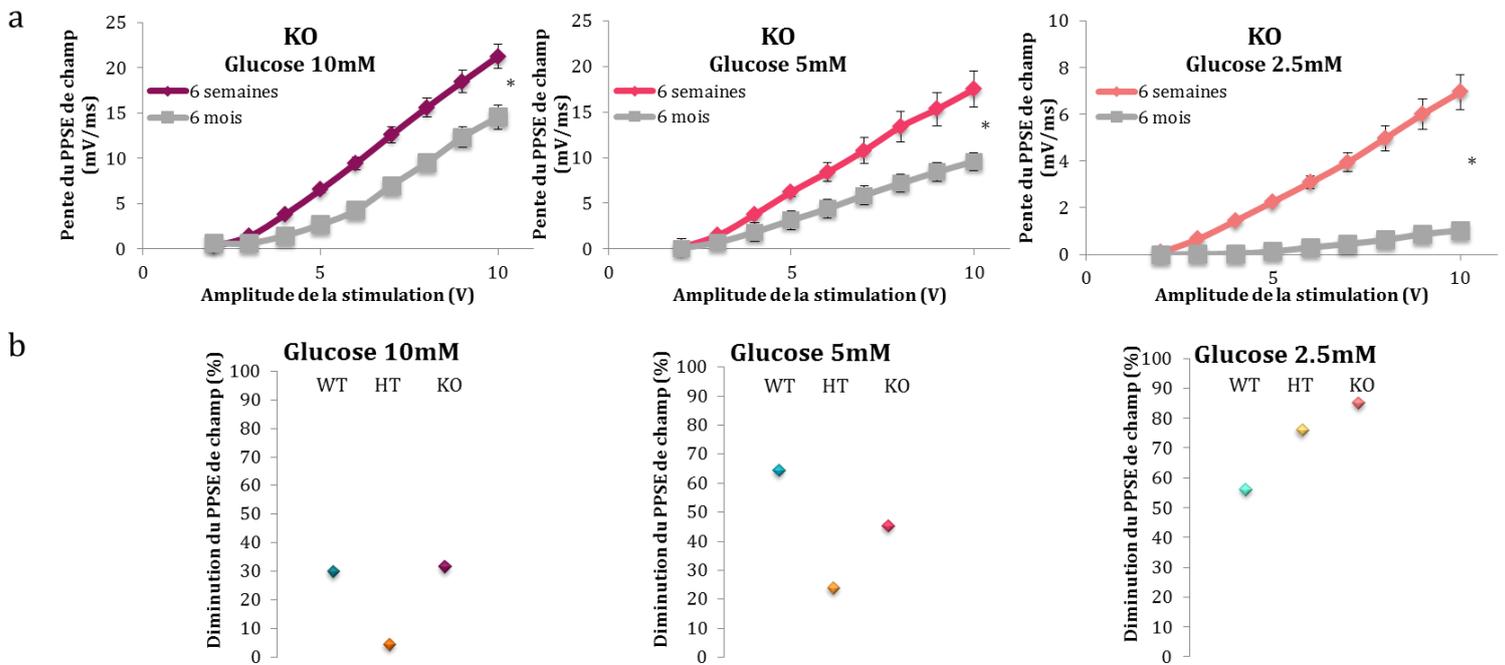


Figure 3. Le vieillissement réduit l'activité synaptique et la tolérance vis-à-vis de la diminution de l'apport en glucose. a) Comparaison des « Input-output » des souris KO âgées de 6 semaines et de 6 mois pour les différentes conditions. b) Pourcentages de diminution de la pente du PPSE de champ maximal entre les deux âges de souris pour les différents génotypes et les différentes concentrations en glucose utilisées. n (tranches) = WT 10mM 6 semaines : 9 ; WT 5mM 6 semaines : 10 ; WT 2.5mM 6 semaines : 11 ; WT 10mM 6 mois : 12 ; WT 5mM 6 mois : 10 ; WT 2.5mM 6 mois : 10 ; HT 10mM 6 semaines : 21 ; HT 5mM 6 semaines : 23 ; HT 2.5mM 6 semaines : 6 ; HT 10mM 6 mois : 15 ; HT 5mM 6 mois : 18 ; HT 2.5mM 6 mois : 15 ; KO 10mM 6 semaines : 20 ; KO 5mM 6 semaines : 14 ; KO 2.5mM 6 semaines : 14 ; KO 10mM 6 mois : 10 ; KO 5mM 6 mois : 10 ; KO 2.5mM 6 mois : 7.

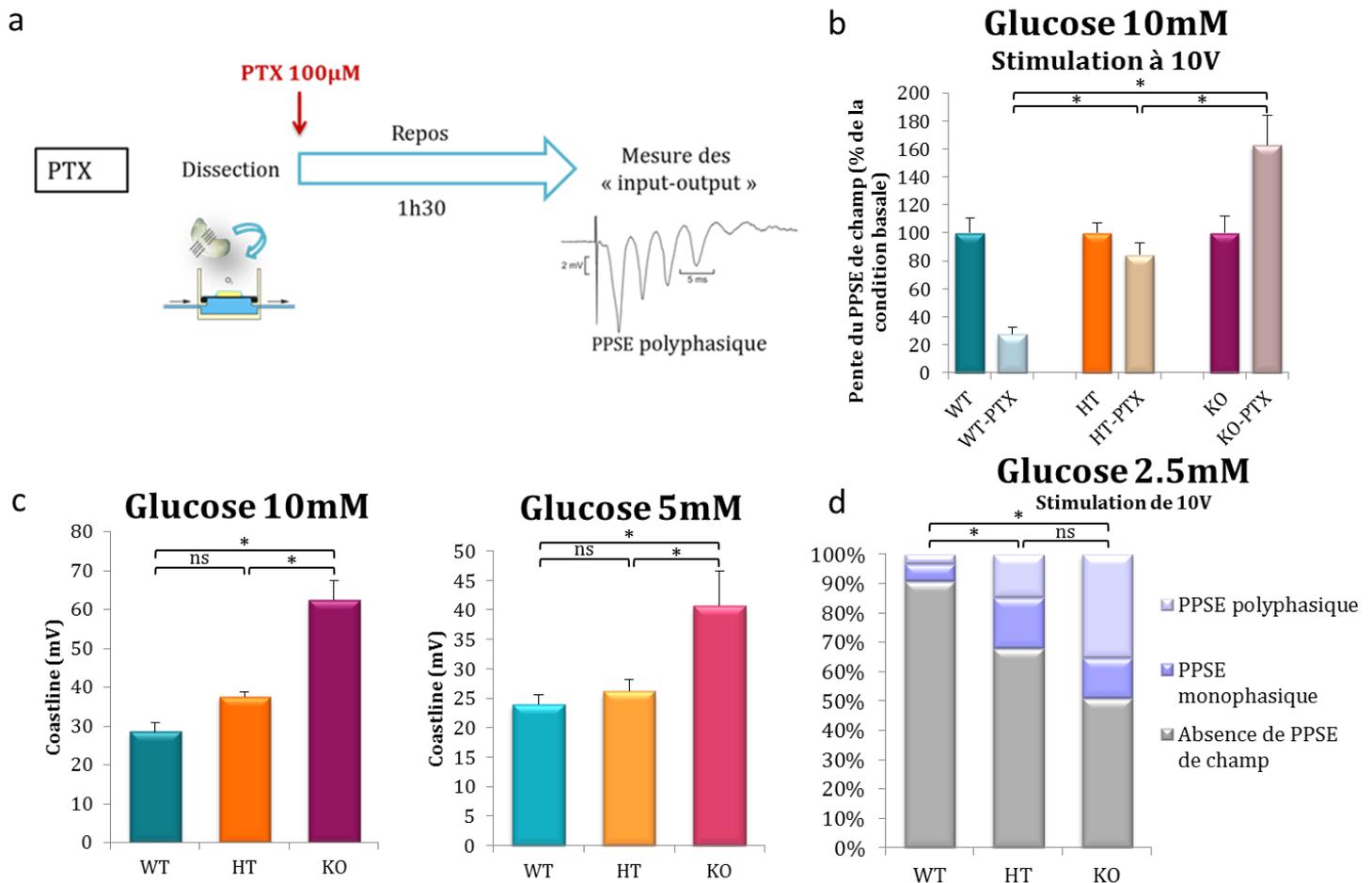
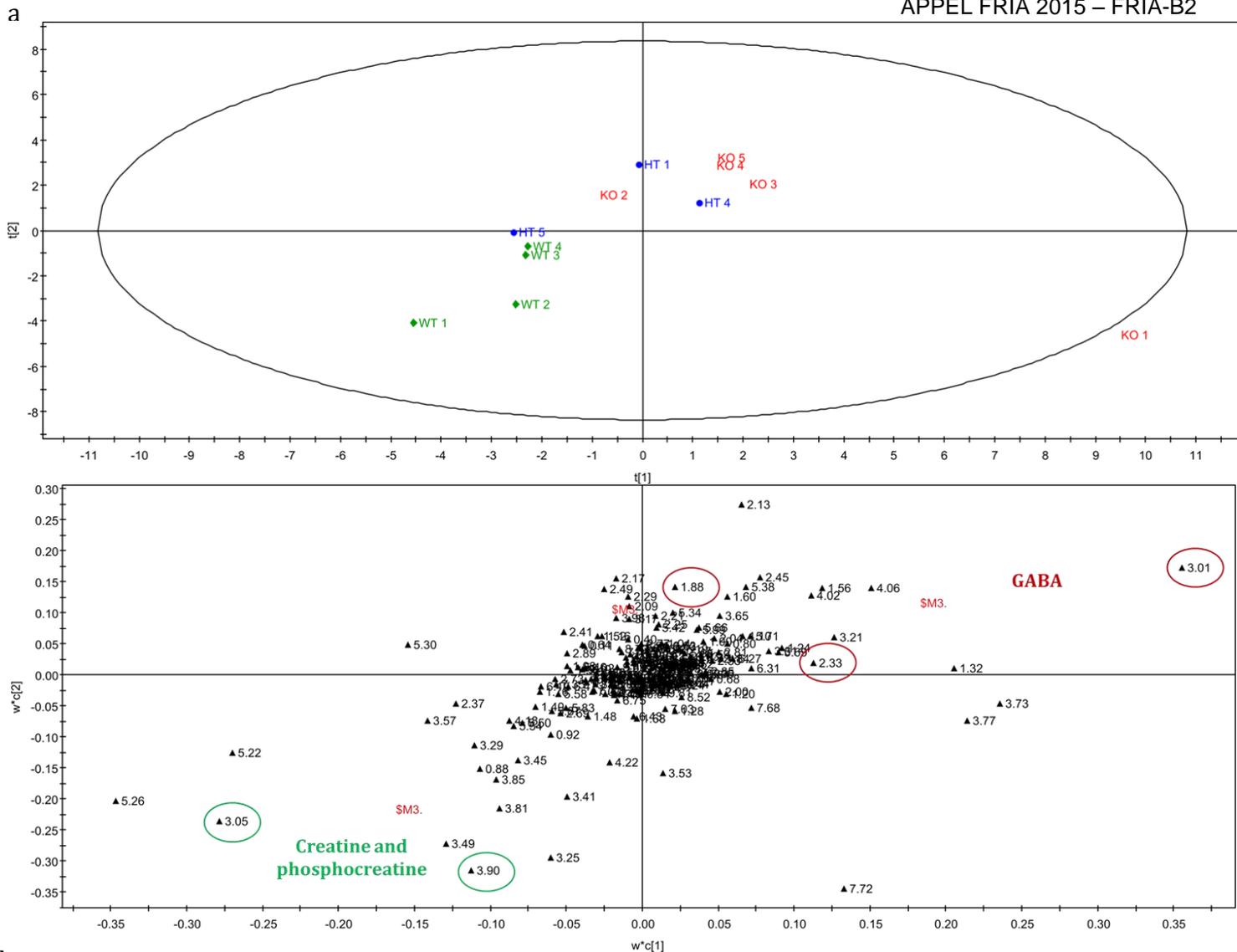


Figure 4. Effet de la picrotoxine sur l'activité des tranches aiguës d'hippocampe de souris de 6 mois. a) Schématisation du protocole. b) L'application de PTX 100µM réduit l'activité synaptique des souris WT et augmente celle des souris KO, sans modifier celle des souris HT. c) L'intensité de l'épilepsie est supérieure chez les souris KO pour les concentrations de 10mM et 5mM de glucose. d) Le PPSE de champ des souris WT est plus souvent absent et moins souvent épileptique chez les souris WT. n (tranches) = WT 10mM : 12 ; WT 10mM PTX : 9 ; HT 10mM : 15 ; HT 10mM PTX : 14 ; KO 10mM : 10 ; KO 10mM PTX : 16 ; WT 5mM PTX : 14 ; HT 5mM PTX : 17 ; KO 5mM PTX : 9 ; n (« input-output » totaux) = WT : 49 ; HT : 52 ; KO : 51.



b

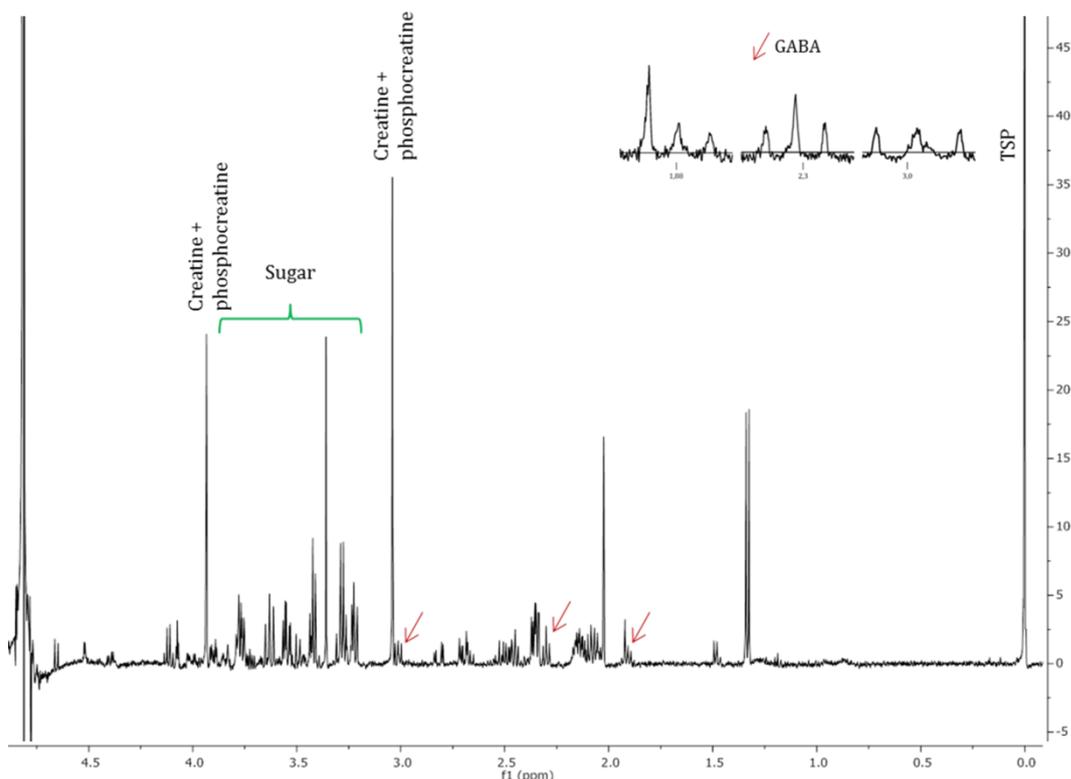


Figure 5. Les souris exprimant différents niveaux d'APP peuvent être discr min es sur base de leur profil métabolique au niveau de l'hippocampe. a) Analyse en composantes principales (score plot et loading plot, PC1 et PC2) des spectres obtenus par résonance magnétique nucléaire du proton au départ de souris WT (n=4), HT (n=3) et KO (n=5). Le score plot renseigne sur la séparation entre les groupes et le loading plot indique les métabolites discr minants, dans ce cas le GABA, la créatine/phosphocréatine et le glucose. b) Exemple de spectre obtenu au départ d'un hippocampe KO.

## **2. PROJET DE RECHERCHES POUR LA 2<sup>NDE</sup> BOURSE**

### **2.1 Objectifs de la recherche**

L'objectif de ce projet est d'approfondir les connaissances de la relation entre l'expression de l'APP et le métabolisme du glucose cérébral ainsi que l'impact de ce dernier sur l'activité métabolique et synaptique. Ceci apporterait de nouvelles informations sur le processus pathologique de la maladie d'Alzheimer et du diabète. Notre hypothèse est que l'APP est impliquée dans le flux énergétique entre le cerveau et la périphérie. Au cours du vieillissement ou dans le cas de pathologies telles que la résistance à l'insuline, la disponibilité en glucose au niveau cérébral peut être réduite, ce qui résulterait en une augmentation compensatoire de l'expression de l'APP. Cette dernière serait le point de départ de la dérégulation de l'homéostasie métabolique et de l'activité des neurotransmetteurs et donc responsable des déficits cognitifs ultérieurs.

### **2.2 Etat de l'art**

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative dévastatrice caractérisée par deux types de lésions : les plaques amyloïdes constituées majoritairement par l'oligomérisation du peptide  $\beta$ -amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires composées de l'enchevêtrement de filaments de la protéine Tau hyperphosphorylée. La maladie s'accompagne également de dysfonctions synaptiques et métaboliques, à la fois causes et conséquences de la neurodégénération. Par exemple, le métabolisme du glucose<sup>1,2</sup> et celui des lipides dont celui du cholestérol<sup>3</sup> sont connus pour être progressivement dérégulés au cours de la pathologie et ce, principalement au niveau du cortex et de l'hippocampe. Ces zones sont marquées par un hypométabolisme général témoignant d'un ralentissement du métabolisme du glucose<sup>1</sup> résultant en partie d'une résistance cérébrale à l'insuline<sup>4</sup> et de la perte progressive de la capacité à capturer le glucose dans les neurones<sup>1,4</sup>. Les patients atteints par la maladie d'Alzheimer présentent un taux de glycolyse réduit<sup>5,6</sup> ainsi qu'une diminution de l'expression des transporteurs cérébraux du glucose GLUT1 et GLUT3<sup>7</sup>. Par ailleurs, l'activité des transporteurs au glutamate est également altérée, ce qui pourrait être à l'origine de phénomènes excitotoxiques<sup>8</sup>.

De nombreuses études ont été consacrées aux rôles néfastes joués par les oligomères du peptide  $\beta$ -amyloïde A $\beta$  42. Cependant, d'autres théories suggèrent que l'APP et ses autres dérivés jouent un rôle dans les processus physiopathologiques. Il est connu que nombre de ces dérivés sont impliqués dans l'activité synaptique et dans le métabolisme, dont celui du glucose<sup>9-12</sup>. L'APP, sous sa forme précurseur, intervient également dans le métabolisme du glucose. Par exemple, elle interagit avec la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et perturbe le bon déroulement de la glycolyse<sup>6</sup>. L'APP est également enchâssée dans la membrane mitochondriale où elle interagit avec l'ATP synthase (complexe V) et l'inhibe, réduisant alors la production d'ATP<sup>13</sup>. Elle réduit également l'activité du complexe IV mais augmente celle du complexe III<sup>14</sup> et bloque la translocation de certaines protéines adressées vers la mitochondrie en interagissant au niveau de TOM<sup>15</sup>. L'APP est aussi capable de stimuler les transporteurs glutamatergiques astrocytaires et ainsi d'améliorer la recapture du glutamate extracellulaire responsable des phénomènes excitotoxiques<sup>16</sup>.

Les souris APP « knockout » présentent une sensibilité accrue vis-à-vis des crises épileptiques<sup>17</sup> et de l'ischémie<sup>18</sup> ainsi qu'une signalisation calcium altérée<sup>19</sup>. Ces souris présentent aussi une altération de certaines formes de LTP et une réduction des PPSI<sup>20-22</sup>. La potentialisation à long terme, définie comme étant le renforcement durable de la transmission synaptique, est un des mécanismes de la plasticité synaptique. Au niveau de l'hippocampe, cette augmentation de la force de connexion entre deux synapses est responsable de la consolidation de certaines formes de mémoire. Une dysfonction de la potentialisation à long terme résulte souvent en des

déficits cognitifs et mnésiques. Les souris APP<sup>-/-</sup> présentent en effet ces déficits et ce, principalement au niveau de la mémoire spatiale<sup>20,23</sup>.

En conditions hypoglycémiques, la transcription de l'APP est augmentée et les épissages alternatifs favorisés aboutissent à la surproduction des isoformes possédant un domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz (KPI)<sup>24</sup>. Ces dernières favorisent l'homodimérisation de l'APP, sa modification de clivage et *in fine* l'apparition d'une toxicité<sup>25-27</sup>. Cette augmentation de l'expression de l'APP est d'ailleurs retrouvée dans la maladie d'Alzheimer<sup>28-30</sup>. **Une modification de l'expression de l'APP cérébrale pourrait conduire à une dérégulation de son clivage et à l'apparition de phénomènes toxiques perturbant l'activité métabolique et synaptique et ainsi être à l'origine des déficits cognitifs et mnésiques retrouvés dans la maladie d'Alzheimer.** Cette hypothèse est soutenue par exemple par le syndrome de Down (trisomie 21) dans lequel trois allèles de l'APP sont présents dans le génome. Les malades présentent des déficits cognitifs et mnésiques sévères, une hypercholestérolémie et une prévalence accrue pour le diabète<sup>31</sup>. De plus, réduire le niveau d'expression de l'APP pourrait avoir des effets positifs sur la cognition. En effet, la plasticité synaptique et les capacités de mémorisation sont restaurées dans un modèle murin de la démence familiale danoise ou de la démence familiale britannique lorsque celui-ci est croisé avec avec des souris hétérozygotes pour le gène de l'APP<sup>32,33</sup>.

## 2.3 Projet de recherche

### Partie 1 : ex vivo

*Cette première partie s'inscrit dans la continuité des expériences réalisées durant la première bourse. Elle a pour objectif de terminer l'étude de l'activité synaptique des tranches aiguës d'hippocampe pour lesquelles la transmission GABAergique est modifiée.*

#### 1. Antagoniste des récepteurs GABA de type A : PicROTOXINE

La PTX a également été ajoutée après la période de repos succédant à la dissection et ce, pendant 30 minutes (Figure 6a). Ceci a permis d'exclure l'hypothèse suggérant que la PTX entraînait l'apoptose des cellules WT. En effet, lors de la courte application de PTX après le repos, le PPSE et la coastline sont toujours diminués chez les WT (Figure 6b). De plus, la réponse de base augmente pendant les 30 minutes durant lesquelles la drogue est ajoutée et c'est uniquement lors de l'enregistrement de l'« input-output » qu'elle diminue. La courbe ne peut d'ailleurs pas être dessinée chez les souris de 6 semaines pour lesquelles le PPSE disparaît temporairement lorsque la stimulation augmente. L'hypothèse qui sera investiguée par la suite est celle de l'épuisement vésiculaire car l'effet observé semble principalement être présynaptique. Pour tester cela, l'« input-output » sera enregistré en augmentant à 1 minute l'intervalle entre deux stimulations. La facilitation et/ou l'inhibition à court terme de la réponse synaptique (PPF/PPI) liées à la régulation du relargage vésiculaire sera étudiée par application de doubles stimulations à intervalles rapprochés (ms).

#### 2. Antagoniste des récepteurs GABA de type B : CGP 55845A

La littérature suggère que les souris APP<sup>-/-</sup> présentent des IPSC inférieurs à ceux des souris sauvages ainsi qu'une réduction de la « paired pulse depression » médiée par le GABA<sup>20,21,34</sup>. Puisque ce phénomène est présynaptique, il paraît important d'étudier le rôle des récepteurs GABA-B car ceux-ci modulent la transmission synaptique (inhibitrice ou excitatrice) à travers un mode d'action postsynaptique (potentiel membranaire) mais également présynaptique (régulation de l'exocytose)<sup>35</sup>. Un antagoniste des récepteurs GABA-B, le CGP 55845A, sera alors ajouté au LCRa pendant une période de 30 minutes afin d'en étudier les effets sur les tranches issues de souris des trois génotypes<sup>36</sup>.

## **Partie 2 : *in vivo***

*Cette seconde partie vise à étudier l'activité métabolique et l'homéostasie des neurotransmetteurs dans le cerveau des souris exprimant 3 niveaux d'APP.*

### 1. Profils métaboliques en condition contrôle ( $^1\text{H}$ RMN)

Les variations métaboliques observées par  $^1\text{H}$ RMN au niveau de l'hippocampe des souris exprimant les divers niveaux d'APP seront complétées par l'analyse des profils métaboliques du cortex, du cervelet et du plasma sanguin.

### 2. Profils métaboliques en hypoglycémie ( $^1\text{H}$ RMN)

Les profils métaboliques de ces différentes structures (hippocampe, cortex, cervelet) et du plasma seront par la suite analysés par  $^1\text{H}$ RMN lors d'une hypoglycémie *in vivo* obtenue par une injection continue d'insuline. Pratiquement, les animaux seront à jeun pendant 6h afin de stabiliser leur glycémie sans la diminuer ou causer un stress métabolique<sup>37</sup>. Ensuite, les souris seront anesthésiées par un flux continu d'isoflurane et deux sondes seront placées en sous cutané au niveau des flans. La première est reliée à l'appareil de monitoring continu du glucose (CGM ; MiniMed®, Medtronic) et la seconde est celle de la pompe à insuline (MiniMed®, Medtronic). Le CGM dose de manière continue le glucose plasmatique et affiche le taux de glucose sanguin grâce à un facteur de corrélation<sup>37</sup>. Une fois les appareils fixés, la glycémie au temps 0 sera relevée et l'injection d'insuline débutera. La glycémie sanguine sera alors diminuée à 3mM de manière stable durant 2h en injectant l'insuline à une concentration de référence de  $120\text{pmol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ <sup>38</sup>. Cependant, cette concentration sera régulièrement adaptée en cours d'expérience car la glycémie sanguine dépend de divers facteurs tels que la souche<sup>38</sup>, le génotype, l'animal...L'hypoglycémie périphérique sera rapidement ressentie au niveau cérébral car il existe une relation linéaire entre le taux de glucose périphérique et cérébral<sup>39</sup>. A la fin des 2h, les structures cérébrales et le plasma seront prélevés et congelés à  $-80^\circ\text{C}$  en prévision des analyses ultérieures.

### 3. Activité métabolique extracellulaire par microdialyses

Les microdialyses viennent en complément des expériences de RMN car elles offrent l'avantage de maintenir l'animal en vie jusque la fin de l'expérience mais aussi et surtout car elles quantifient toutes les molécules solubles du liquide extracellulaire, le milieu extracellulaire étant le compartiment où les neuromédiateurs assurent leur fonction. En pratique, la sonde sera insérée au niveau de l'hippocampe de l'animal anesthésié et la perfusion de la solution débutera 24h plus tard. Les métabolites quantifiés seront les principaux neuromédiateurs (GABA, glutamate..) ainsi que le glucose et le lactate. Le dernier avantage de cette technique est qu'elle permettra de fournir plus d'informations sur le glutamate dont les pics sont confondus avec ceux de la glutamine en  $^1\text{H}$ RMN. De l'insuline pourra être administrée par injection sous-cutanée pendant la perfusion afin de quantifier ces mêmes métabolites en condition d'hypoglycémie.

### 4. Catabolisme du glucose ( $^{13}\text{C}$ RMN)

La RMN du proton permet de déterminer les modifications générales de l'activité métabolique mais pas d'étudier spécifiquement le devenir d'une molécule. La RMN du carbone sera alors utilisée afin de suivre spécifiquement le catabolisme de la molécule de glucose à travers la glycolyse et le cycle de Krebs ainsi que les productions des neuromédiateurs glutamate et GABA dérivant de ce dernier. Ce suivi est rendu possible grâce à l'injection intrapéritonéale de  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose (543mg/kg) et de  $[1,2-^{13}\text{C}]$  acétate (504 mg/kg) 15 minutes avant l'extraction des structures cérébrales et congélation. Ainsi, les diverses molécules issues du catabolisme du glucose seront enrichies en C13, ce qui permettra l'obtention de pics ne correspondant qu'aux

molécules d'intérêt et donc au suivi du catabolisme du glucose (et de l'acétate). Le marquage s'effectue conjointement sur le glucose et sur l'acétate car le glucose est utilisé à la fois par les neurones et les astrocytes tandis que l'acétate est exclusivement utilisé par les astrocytes. Les carbones marqués dans les dérivés seront différents en fonction de la molécule à l'origine du dérivé. Il sera alors possible de tirer des conclusions sur le rôle des neurones et des astrocytes dans la formation des divers métabolites d'intérêt <sup>40</sup>.

## 5. Expériences complémentaires

Les récepteurs des métabolites dont l'expression varie selon le génotype (GABA, glutamate) ainsi que les transporteurs au glucose (GLUT1 et GLUT3) seront quantifiés par Western-Blotting (des récepteurs et transporteurs de surface) et immunohistochimie.

### Partie 3 : *in vitro*

*Cette dernière partie a pour but d'analyser l'activité synaptique, métabolique ainsi que l'expression de l'APP dans les diverses conditions préalablement décrites sur un modèle de culture primaire mixte corticale.*

Des cultures de chaque génotype seront obtenues en effectuant des croisements KOxKO, WTxWT et KOxWT. D'après la littérature, aucune différence de croissance ou de survie des neurones APP<sup>-/-</sup> n'est à signaler dans des conditions habituelles de culture <sup>41</sup>. La dissection sera réalisée à P0 et le milieu de culture contiendra une concentration normale ou réduite en glucose. Ce modèle apporte l'avantage d'étudier les modifications métaboliques et synaptiques à plus long terme.

#### 1. Enregistrements électrophysiologiques intracellulaires (Patch-clamp)

Les expériences de patch-clamp en conformation « whole cell » permettront l'analyse de l'activité des récepteurs de surface au glutamate (AMPA, NMDA, kainate) ainsi que de ceux au GABA-A. L'activité du réseau sera étudiée à travers la mesure des courants miniatures spontanés ou évoqués (mEPSc et mIPSc).

#### 2. Profils métaboliques intracellulaires et extracellulaires (RMN du proton)

La densité cellulaire nécessaire aux expériences de patch clamp est faible, ce qui permet d'ensemencer les cellules en excès dans des boîtes T75 et de les séparer du milieu après culture pour déterminer, en RMN du proton, les variations métaboliques intracellulaires et extracellulaires.

#### 3. Impact du métabolisme du glucose sur l'expression de l'APP

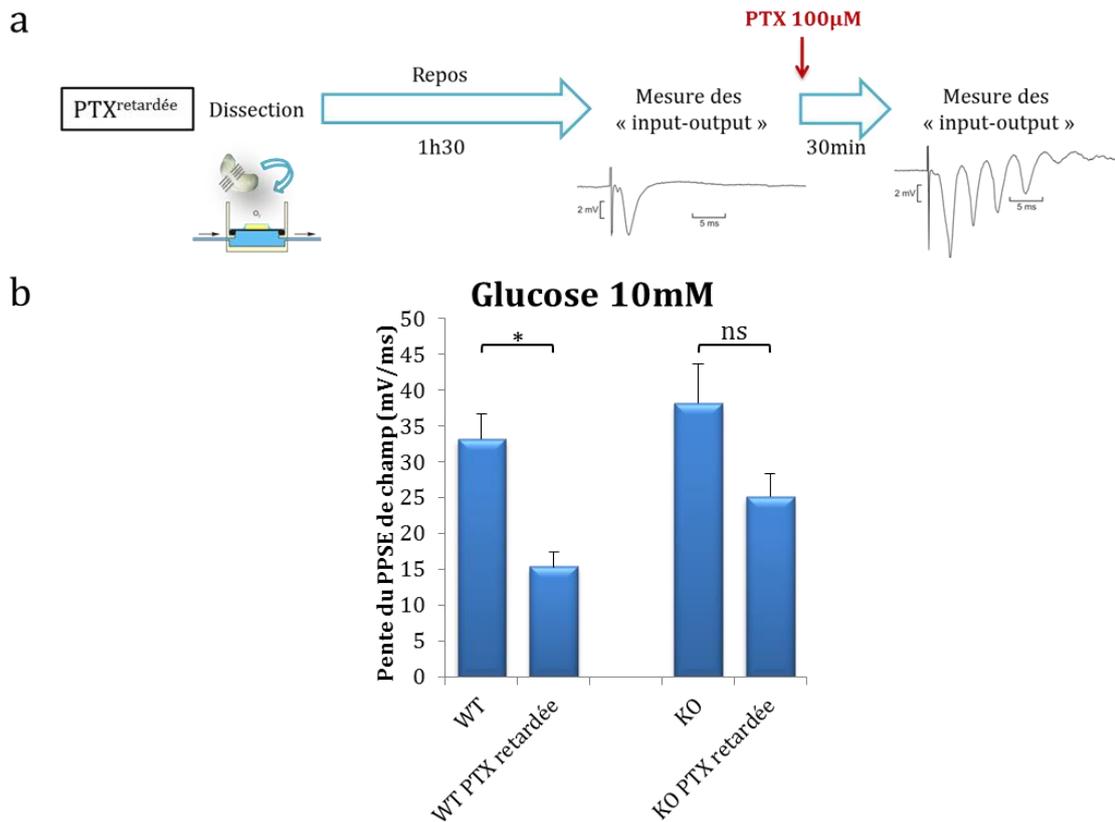
Les Western-Blotting réalisés sur extraits tissulaires d'hippocampes se sont révélés infructueux. Néanmoins, un des anticorps testés semble permettre l'obtention de résultats satisfaisants en culture primaire corticale et sera donc utilisé. Les ARNm des différents isoformes seront également quantifiés par qRT PCR utilisant une sonde taqman. L'expression des protéines APP et des ARNm sera quantifiée en condition contrôle, en condition hypoglycémique et en condition contrôle avec ajout d'insuline. Les fonctions de l'insuline au niveau cérébral sont différentes de celles en périphérie mais pourraient être interconnectées avec les fonctions de l'APP et/ou de l'A $\beta$  <sup>42</sup>.

## 2.4. Plan de travail

Puisque les résultats obtenus pour les souris de 6 mois et de 6 semaines sont similaires, les expériences seront réalisées uniquement sur le groupe de souris le plus âgé.

|   | 2015   |   |   |   | 2016 |   |   |   |   |   |   |   | 2017 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|--|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|   | S  | O | N | D | J    | F | M | A | M | J | J | A | S    | O | N | D | J | F | M | A | M | J | J | A |
| Obtention des portées et géotypages   |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | <b>Partie 1 : ex vivo</b>                        |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Antagoniste des récepteurs GABA-A : Picrotoxine                               |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Antagoniste des récepteurs GABA-B : CGP 55845A                                |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | <b>Partie 2 : in vivo</b>                        |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Profils métaboliques en condition contrôle ( $^1\text{H}$ RMN)                |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Profils métaboliques en hypoglycémie ( $^1\text{H}$ RMN)                      |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Activité métabolique extracellulaire par microdialyses                        |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Catabolisme du glucose ( $^{13}\text{C}$ RMN)                                 |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Western-Blotting et immunohistochimies  |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | <b>Partie 3 : in vitro</b>                       |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Patch-Clamp   |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Profils métaboliques intracellulaires et extracellulaires ( $^1\text{H}$ RMN) |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Impact du métabolisme du glucose sur l'expression de l'APP                    |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | <b>Rédaction de la thèse et des publications</b> |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |  |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

## 2.5. Figure



**Figure 6. Application de la PTX retardée. a) Paradigme expérimental. b) Lors de l'application de la PTX après le repos, la pente du PPSE de champ des souris WT se réduit plus que celui des souris KO.**

## 2.6. Références bibliographiques

- Mosconi, L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32**, 486–510 (2005).
- Chen, Z. & Zhong, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* **108**, 21–43 (2013).
- Gamba, P. *et al.* The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1259**, 54–64 (2012).
- De la Monte, S. M. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs* **72**, 49–66 (2012).
- Bigl, M., Apelt, J., Eschrich, K. & Schliebs, R. Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **110**, 77–94 (2003).
- Mazzola, J. L. & Sirover, M. A. Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J. Neurosci. Res.* **71**, 279–285 (2003).
- Simpson, I. A., Chundu, K. R., Davies-Hill, T., Honer, W. G. & Davies, P. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **35**, 546–551 (1994).
- Chen, K. H., Reese, E. A., Kim, H.-W., Rapoport, S. I. & Rao, J. S. Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. *J. Alzheimers Dis. JAD* **26**, 755–766 (2011).
- Hamid, R. *et al.* Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. *J. Neurochem.* **102**, 1264–1275 (2007).
- Ward, M. W. *et al.* The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) disrupts actin dynamics and mitochondrial bioenergetics. *J. Neurochem.* **113**, 275–284 (2010).
- Mattson, M. P., Guo, Z. H. & Geiger, J. D. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J. Neurochem.* **73**, 532–537 (1999).
- Kim, H. S. *et al.* Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 1508–1517 (2000).

13. Schmidt, C. *et al.* Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Mol. Psychiatry* **13**, 953–969 (2008).
14. Rhein, V. *et al.* Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **29**, 1063–1071 (2009).
15. Spuch, C., Ortolano, S. & Navarro, C. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *J. Aging Res.* **2012**, 324968 (2012).
16. Masliah, E. *et al.* Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 12548–12554 (1998).
17. Steinbach, J. P. *et al.* Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death Differ.* **5**, 858–866 (1998).
18. Koike, M. A. *et al.* APP knockout mice experience acute mortality as the result of ischemia. *PLoS One* **7**, e42665 (2012).
19. Linde, C. I., Baryshnikov, S. G., Mazzocco-Spezia, A. & Golovina, V. A. Dysregulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C1502–1512 (2011).
20. Seabrook, G. R. *et al.* Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* **38**, 349–359 (1999).
21. Fitzjohn, S. M. *et al.* Similar levels of long-term potentiation in amyloid precursor protein -null and wild-type mice in the CA1 region of picrotoxin treated slices. *Neurosci. Lett.* **288**, 9–12 (2000).
22. Senechal, Y., Kelly, P. H. & Dev, K. K. Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behav. Brain Res.* **186**, 126–132 (2008).
23. Dawson, G. R. *et al.* Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* **90**, 1–13 (1999).
24. Shi, J., Xiang, Y. & Simpkins, J. W. Hypoglycemia enhances the expression of mRNA encoding beta-amyloid precursor protein in rat primary cortical astroglial cells. *Brain Res.* **772**, 247–251 (1997).
25. Ben Khalifa, N. *et al.* Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 855–867 (2012).
26. Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S. & Masliah, E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 901–911 (1997).
27. Chua, L.-M., Lim, M.-L. & Wong, B.-S. The Kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437**, 642–647 (2013).
28. Matsui, T. *et al.* Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1161**, 116–123 (2007).
29. Panegyres, P. K., Zafiris-Toufexis, K. & Kakulas, B. A. Amyloid precursor protein gene isoforms in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* **173**, 81–92 (2000).
30. Preece, P. *et al.* Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **122**, 1–9 (2004).
31. Roizen, N. J. & Patterson, D. Down's syndrome. *Lancet Lond. Engl.* **361**, 1281–1289 (2003).
32. Tamayev, R., Matsuda, S., Giliberto, L., Arancio, O. & D'Adamio, L. APP heterozygosity averts memory deficit in knockin mice expressing the Danish dementia BRI2 mutant. *EMBO J.* **30**, 2501–2509 (2011).
33. Tamayev, R. & D'Adamio, L. Memory deficits of British dementia knock-in mice are prevented by A $\beta$ -precursor protein haploinsufficiency. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 5481–5485 (2012).
34. Wang, B. *et al.* The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 13314–13325 (2014).
35. Kornau, H.-C. GABA(B) receptors and synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* **326**, 517–533 (2006).
36. Pham, T. M., Nurse, S. & Lacaille, J. C. Distinct GABAB actions via synaptic and extrasynaptic receptors in rat hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.* **80**, 297–308 (1998).
37. Han, B. G. *et al.* Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E981–986 (2008).
38. Berglund, E. D. *et al.* Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes* **57**, 1790–1799 (2008).
39. Seaquist, E. R. & Öz, G. Sweet and low: measuring brain glucose during hypoglycemia. *Diabetes* **61**, 1918–1919 (2012).
40. Walls, A. B. *et al.* Knockout of GAD65 has major impact on synaptic GABA synthesized from astrocyte-derived glutamine. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **31**, 494–503 (2011).
41. White, A. R. *et al.* Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 6207–6217 (1998).
42. Plum, L., Schubert, M. & Brüning, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **16**, 59–65 (2005).