

Nom et prénom du proposant	Gloire Mélanie
Numéro de référence SEMAPHORE	19870000

PARTIE SCIENTIFIQUE DU PROJET

LANGUE PRINCIPALE CHOISIE = FRANÇAIS

Cette partie comprend les éléments suivants :

1. Description du projet de recherches
2. **Rapport d'activités** concernant la première année du doctorat (**uniquement** pour les candidats 1^{er} bourse, **2^e année***)
3. Description de l'environnement de travail
4. Résumé du mémoire de master ou équivalent
5. Commentaires additionnels (optionnel)
6. Calendrier mensuel des travaux de doctorat

***Le candidat à une 1^{er} bourse, 2^e année a travaillé 1 an ou plus, à temps plein, au projet de thèse qu'il soumet au F.R.I.A.**

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. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHES

1.1. Objectifs de la recherche

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.

1.2. 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 β -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 {1, 2} et celui des lipides dont celui du cholestérol {3} 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 {1} résultant en partie d'une résistance cérébrale à l'insuline {4} et de la perte progressive de la capacité à capturer le glucose dans les neurones {1, 4}. Les patients atteints par la maladie d'Alzheimer présentent un taux de glycolyse réduit {5,6} ainsi qu'une diminution de l'expression des transporteurs cérébraux du glucose GLUT1 et GLUT3 {7}. Ces similitudes avec le diabète font que la maladie d'Alzheimer commence également à être appelée le diabète de type III. Par ailleurs, l'activité des transporteurs au glutamate est également altérée, ce qui pourrait être à l'origine de phénomènes excitotoxiques {8}.

De nombreuses études ont été consacrées aux rôles néfastes joués par les oligomères du peptide β -amyloïde $A\beta$ 42. Cependant, on pense actuellement que la rupture dans l'homéostasie de production des autres dérivés protéolytiques de l'APP pourrait être tout aussi délétère que la surexpression de la forme la plus toxique du peptide β -amyloïde. Les recherches actuelles portent dès lors sur l'élucidation des rôles physiopathologiques de ces dérivés mais aussi sur ceux du précurseur lui-même. Cette recherche est compliquée par le fait que certains dérivés pourraient être neuroprotecteurs alors que d'autres auraient un rôle plus ambivalent, voire néfaste. Dans tous les cas, nombre d'entre eux sont impliqués dans l'activité synaptique et dans le métabolisme, dont celui du glucose.

Le domaine intracellulaire C_t de l'APP (AICD) est par exemple connu pour être un activateur transcriptionnel et semble modifier le contenu intracellulaire en ATP et la signalisation calcium {9, 10}. Il influence également la proportion des gangliosides cérébraux {11}. Le fragment soluble α de l'APP (sAPP α) semble être essentiellement neuroprotecteur tandis que les fonctions du fragment soluble β de l'APP, libéré dans le milieu extracellulaire par action de la β -sécrétase, sont en grande partie opposées à celles jouées par sAPP α {12}. sAPP α est capable d'augmenter le transport du glucose au niveau neuronal {13} ou de restaurer la potentialisation à long terme dans un modèle de souris « knockin » {14}. À l'opposé, certains fragments C_t de l'APP sont capables de réduire la potentialisation à long terme et de rendre les neurones plus sensibles à l'excitotoxicité en dérégulant l'homéostasie calcique {15, 16}. L'APP sous sa forme précurseur joue également des rôles dans l'activité synaptique et métabolique neuronale. Pierrot *et al.* (2013) ont récemment démontré que l'APP interagit avec SREBP au niveau de l'appareil de Golgi, inhibant la translocation du facteur de transcription au niveau du noyau et réduisant la synthèse et l'efflux du cholestérol. Cette diminution du renouvellement du cholestérol cérébral a un effet inhibiteur sur l'activité des réseaux neuronaux {17}. L'APP modifie également le métabolisme énergétique du glucose et ce, de diverses manières. En effet, la protéine interagit avec la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et perturbe le bon déroulement de la glycolyse {6}. L'APP est également retrouvée enchâssée dans la membrane mitochondriale où elle interagit avec l'ATP synthase (complexe V) et l'inhibe, réduisant alors la production d'ATP {18}. Elle réduit également l'activité du complexe IV mais augmente celle du complexe III {19} et bloque la translocation de certaines protéines adressées vers la mitochondrie en interagissant au niveau de TOM {20}. L'APP est cependant connue pour être neuroprotectrice. Par exemple, elle protège de l'excitotoxicité puisque les souris APP « knockout » présentent une sensibilité accrue vis-à-vis des crises épileptiques {21} et de l'ischémie {22}, probablement à cause d'une transmission GABAergique défectueuse {23} et d'une signalisation calcium altérée {24}. L'APP est d'ailleurs capable de stimuler les transporteurs glutamatergiques astrocytaires et ainsi d'améliorer la recapture du glutamate extracellulaire {25}. La protéine semble également nécessaire à une induction correcte de la potentialisation à long terme (LTP) puisque celle-ci s'avère altérée dans le modèle transgénique dépourvu de l'APP {26, 27}. 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 des capacités de mémorisation et d'apprentissage.

Une dysfonction de la potentialisation à long terme, tant dans son induction que dans son maintien, est donc la cause de déficits cognitifs et mnésiques. Dès lors, il paraît évident que si l'APP est impliqué dans l'induction de la LTP, les souris dépourvues du gène présentent des déficits mnésiques. La mémoire spatiale est particulièrement atteinte {26, 28}.

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) {29}. Ces dernières sont considérées comme néfastes car la possession de ce domaine favorise l'homodimérisation de l'APP qui, elle-même, modifie la protéolyse du précurseur ainsi que les rôles joués par celui-ci {30}. De plus, ce domaine réduit l'activité de nombreuses enzymes mitochondriales {31}. L'APP pourrait donc devenir toxique lorsque l'apport en glucose est réduit. D'autre part, les effets de la surexpression de l'APP en conditions non-hypoglycémiques sont controversés. Dans le syndrome de Down dans lequel la répartition des chromosomes homologues formant la paire 21 est altérée au cours de la métaphase I de méiose, 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. Une étude portant sur un modèle murin de surexpression de l'APP confirme une diminution de la capacité d'utilisation du glucose ainsi que des déficits de mémorisation spatiale {32} et une autre affirme que la surexpression d'un fragment de l'APP autre qu'A β est létale pour la souris {33}. À l'opposé, une autre publication a déterminé que la surexpression de la forme sauvage de l'APP améliorerait les capacités de mémorisation {34} ainsi que l'activité des transporteurs glutamatergiques {35}. Cependant, dans le cas où la proportion des isoformes possédant le domaine KPI est augmentée, l'activité des transporteurs est réduite {35, 36}.

Il semble donc évident que les rôles joués par l'APP et ses dérivés protéolytiques autres que le peptide β -amyloïde sous sa forme oligomérisée sont ambivalents et encore fortement controversés.

1.3. Projet de recherche

Ce projet de recherche s'inscrit dans la continuité de mon mémoire au cours duquel nous avons mis en évidence que l'APP modulait la sensibilité vis-à-vis de conditions semblables à une hypoglycémie. Des tranches d'hippocampe de souris préparées à partir de souris APP « knockout », hétérozygotes et sauvages ont été placées dans une installation mettant en circulation continue du liquide céphalorachidien de composition ionique proche de celle du liquide naturel mais appauvri en glucose et ont été stimulées électriquement au niveau des collatérales de Schaffer afin d'évaluer l'efficacité de la réponse synaptique. Dans ces conditions, les résultats obtenus ne témoignaient pas des effets protecteurs de l'APP habituellement décrits dans la littérature. En effet, nous avons observé que les tranches préparées à partir de souris sauvages étaient les moins résistantes face à la restriction en glucose. Néanmoins, ce résultat interpellant pourrait être expliqué par le fait que l'hypoglycémie augmente la synthèse de l'APP ainsi que la proportion en isoformes présentant le domaine délétère, comme expliqué précédemment. Allant dans le sens de cette hypothèse, les souris ne possédant qu'un allèle fonctionnel de l'APP se sont avérées être les plus résistantes face à l'hypoglycémie.

Ne posséder qu'un allèle de l'APP pourrait également être protecteur hors des conditions hypoglycémiques. Ainsi, deux publications ont prouvé que le croisement d'un modèle de souris de la démence familiale danoise ou de la démence familiale britannique avec les souris hétérozygotes pour le gène de l'APP restaurait la plasticité synaptique et les capacités de mémorisation {37, 38}. En fonction de sa concentration, l'APP pourrait donc être soit protectrice soit délétère. Mon projet consistera alors à étudier l'influence de la concentration en APP ainsi que de la proportion des isoformes sur le métabolisme du glucose en utilisant des tranches aiguës d'hippocampe de souris sauvages, hétérozygotes pour le gène de l'APP ou dépourvues de ce même gène. Pour ce faire, l'activité électrique des tranches incubées dans du liquide

céphalorachidien artificiel contenant diverses concentrations en glucose sera mesurée, les métabolites seront ensuite extraits et la RMN du proton permettra de déterminer les divergences dans le métabolome des trois génotypes pour les diverses concentrations en glucose. Ces mesures sont pertinentes pour ce modèle expérimental car la métabonomique a déjà mis en évidence de nombreuses altérations métaboliques dans le cadre de la maladie d'Alzheimer {39}. La vitesse d'incorporation du glucose dans les cellules neurales et sa vitesse de métabolisation seront également quantifiées par marquage au carbone 13 du glucose incubant les tranches {40}.

La régulation du métabolisme du glucose par l'APP et ses dérivés pourrait avoir un lien direct avec le contrôle de l'excitotoxicité. L'hypothèse est qu'un catabolisme réduit du glucose diminuerait la production en ATP réduisant l'activité des pompes Na^+/K^+ utilisant 60% de l'énergie du neurone. Dès lors, l'activité des transporteurs glutamatergiques, dépendants des gradients sodium et potassium pour leur fonctionnement, serait réduite. L'excès de glutamate extracellulaire activerait les récepteurs NMDA extrasynaptiques, responsables des phénomènes excitotoxiques. L'étude de ces phénomènes excitotoxiques induits dans les trois groupes de tranches d'hippocampe exposées aux différentes concentrations en glucose témoignera de l'importance de la régulation du métabolisme du glucose dans le contrôle de l'excitotoxicité.

Notons que le modèle expérimental choisi permet d'étudier le rôle de l'APP et de ses dérivés protéolytiques sans prendre en compte les nombreux effets néfastes joués par l'oligomérisation du peptide β -amyloïde puisque l'APP murin est dépourvu de la séquence d'oligomérisation et que l'A β sous sa forme monomérique est connu pour être neurotrophique et protecteur {12}.

Cependant, chez les souris APP « knockout », il est difficile d'étudier l'effet purement dû à l'APP puisque des mécanismes compensatoires sont mis en place par les homologues APLP1 et APLP2 {41}. APLP2 étant impliqué dans la transmission synaptique {42} et l'homéostasie du glucose {43}, des souris de la même souche mais déficientes pour *APLP2* seront également utilisées lors de ces études. Dans ce cas, il sera nécessaire de prendre en compte les effets compensatoires joués par l'APP.

1.4. Plan de travail

Les expériences qui seront réalisées au cours des quatre prochaines années porteront majoritairement sur l'hippocampe de souris B6.129S7 de trois génotypes : + / + , + / *App*^{tm1Dbo}/J et *App*^{tm1Dbo}/J / *App*^{tm1Dbo}/J. Des souris B6.129S7 + / *Aplp2*^{tm1Dbo}/J et *Aplp2*^{tm1Dbo}/J / *Aplp2*^{tm1Dbo}/J seront également utilisées. Quelques que soient les expériences, trois concentrations en D-glucose seront utilisées, provoquant ou non une « hypoglycémie cérébrale » : [10 mM], [5 mM] et [2.5 mM]. Puisque la majorité des anomalies phénotypiques des souris APP « knockout » apparaissent à la 14^{ème} semaine {26}, les divergences métaboliques ou synaptiques seront recherchées pour deux groupes d'animaux : des souris âgées de 6 à 10 semaines et des souris âgées de plus de 14 semaines. Si aucune différence n'apparaît dans les analyses, les deux groupes seront fusionnés.

Les dix premiers mois du projet seront consacrés aux expériences de « Western-Blotting » et de PCR quantitatives en temps réel visant à déterminer l'expression de l'ARN messager de l'APP et des différentes isoformes de la protéine pour les divers génotypes et pour les différentes concentrations de D-glucose. Cette période permettra également d'apporter les premiers indices sur l'hypothèse formulée au cours de mon mémoire, à savoir que le déficit en glucose aboutirait au déclenchement de processus excitotoxiques dont l'importance serait dépendante de la concentration en APP. L'activité synaptique sera déterminée au départ de tranches d'hippocampe incubées en présence d'agents pharmacologiques antagonistes des récepteurs NMDA ou des récepteurs AMPA perméables au calcium. L'excitabilité sera évaluée en présence de picrotoxine. L'effondrement des gradients électrochimiques sera vérifié par des expériences de « patch-clamp » mesurant l'activité des canaux potassiques dépendants de l'ATP et des pompes Na^+/K^+ ATPase.

Plus d'une année de recherche sera nécessaire à l'analyse du métabolisme des souris B6.129S7 présentant un allèle *App*^{tm1^{Db}o}/J ou les deux. Le métabolisme du glucose sera particulièrement étudié et ce, au travers d'une approche métabonomique. La signature métabonomique de ces souris transgéniques pour les divers fluides ou tissus biologiques est encore inconnue à ce jour, autant en condition normoglycémique qu'en condition hypoglycémique. Dans le cadre du projet, les tranches seront incubées dans un liquide céphalorachidien artificiel contenant les diverses concentrations en D-glucose précédemment citées et les mesures témoignant de l'activité neuronale (PPSE, PPF...) seront réalisées avant que les métabolites ne soient extraits au départ de ces tranches et que les spectres RMN ne soient analysés. Un intérêt supplémentaire pourra porter sur le glucose lui-même, le pyruvate, le lactate, l'ATP et le NA(D)PH. Les mêmes expériences seront réalisées au départ d'animaux placés en réelle hypoglycémie par injection intraveineuse de chlorpropamide (Diabinese®), un agent pharmacologique stimulant la production d'insuline {44}. L'hippocampe sera alors disséqué, les métabolites extraits et les spectres dressés. À nouveau, il sera profitable d'utiliser ces expériences pour déterminer l'activité synaptique *in vivo* présentée par l'hippocampe de ces souris. La vitesse d'incorporation du D-glucose dans les cellules neurales ainsi que sa métabolisation seront déterminées à l'aide d'un marquage du D-glucose au carbone 13. Les transporteurs de glucose neuronaux (GLUT1 et GLUT3) seront quantifiés par « Western-Blotting », PCR quantitatives en temps réel et immunocytochimie.

Ces résultats permettront d'enchaîner durant une année sur l'étude des phénomènes excitotoxiques déclenchés par l'hypométabolisme du glucose *in vivo*. Des expériences de microdialyse seront utilisées pour quantifier le glutamate, le GABA et le glucose extracellulaires. L'expression et l'activité des transporteurs au glutamate seront déterminées par « Western-Blotting », PCR quantitatives en temps réel, immunocytochimie et mesure de la capture des substrats tritiés.

Les neuf derniers mois seront consacrés à la détermination du ou des dérivés protéolytiques de l'APP jouant ce rôle protecteur/délétère sur le métabolisme du glucose. Pour cela, les inhibiteurs des différentes sécrétases seront utilisés sur cultures, la production de certains dérivés sera stimulée ou inhibée par des agents pharmacologiques et le milieu provenant des cultures de neurones sauvages sera transféré sur les cellules dépourvues du gène de l'APP. Les résultats de ces expériences seront analysés par métabonomique et par électrophysiologie.

1.5. Références

1. MOSCONI, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular*, 32(4), 486-510.
2. CHEN, Z. et ZHONG, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, (13)00053-1.
3. GAMBA, P., TESTA, G., SOTTERO, B., GARGIULO, S., POLI, G. et LEONARDUZZI, G. (2012). The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259, 54.
4. DE LA MONTE, SM. (2012). Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*, 72(1), 49-66.
5. BIGL, M., APELT, J., ESCHRICH, K. et SCHLIEBS, R. (2003). Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *Journal of Neural Transmission*, 110(1), 77-94.
6. MAZZOLA, JL. et SIROVER, MA. (2003). Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *Journal of Neuroscience Research*, 71(2), 279-285.

7. SIMPSON, IA., CHUNDU, KR., DAVIES-HILL, T., HONER, WG. et DAVIES, P. (1994). Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 35(5), 546-551.
8. CHEN, KH., REESE, EA., KIM, HW., RAPOPORT, SI. et RAO, JS. (2011). Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(4), 755-766.
9. HAMID, R., KILGER, E., WILLEM, M., VASSALLO, N., KOSTKA, M., BORNHÖVD, C., REICHERT, AS., KRETZSCHMAR, HA., HAASS, C. et HERMS, J. (2007). Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. *Journal of neurochemistry*, 102(4), 1264-1275
10. WARD, MW., CONCANNON, CG., WHYTE, J., WALSH, CM., CORLEY, B. et PREHN, JH. (2010). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) disrupts actin dynamics and mitochondrial bioenergetics. *Journal of neurochemistry*, 113(1), 275-284.
11. GRIMM, MO., ZINSER, EG., GRÖSGEN, S., HUNSDÖRFER, B., ROTHHAAR, TL., BURG, VK., KAESTNER, L., BAYER, TA., LIPP, P., MÜLLER, U., GRIMM, HS. et HARTMANN, T. (2012). Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One*, 7(3), e34095.
12. CHASSEIGNEAUX, S. et ALLINQUANT, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of neurochemistry*, 1, 99-108.
13. MATTSON, MP., GUO, ZH. et GEIGER, JD. (1999). 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. *Journal of neurochemistry*, 73(2), 532-537.
14. RING, S., WEYER, SW., KILIAN, SB., WALDRON, E., PIETRZIK, CU., FILIPPOV, MA., HERMS, J., BUCHHOLZ, C., ECKMAN, CB., KORTE, M., WOLFER, DP. et MÜLLER, UC. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*, 27(29), 7817-7826.
15. CULLEN, WK., SUH, YH., ANWYL, R. et ROWAN, MJ. (1997). Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*, 8(15), 3213-3217.
16. KIM, HS., PARK, CH., CHA, SH., LEE, JH., LEE, S., KIM, Y., RAH, JC., JEONG, SJ. et SUH, YH. (2000). Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *The FASEB Journal*, 14(11), 1508-1517.
17. PIERROT, N., TYTECA, D., D'AURIA, L., DEWACHTER, I., GAILLY, P., HENDRICKX, A., TASIAUX, B., HAYLANI, LE., MULS, N., N'KULI, F., LAQUERRIÈRE, A., DEMOULIN, JB., CAMPION, D., BRION, JP., COURTOY, PJ., KIENLEN-CAMPARD, P. et OCTAVE, JN. (2013). Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity. *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), 608-625.
18. SCHMIDT, C., LEPSVERDIZE, E., CHI, SL., DAS, AM., PIZZO, SV., DITYATEV, A. et SCHACHNER, M. (2008). Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Molecular Psychiatry*, 13(10), 953-969.
19. RHEIN, V., BAYSANG, G., RAO, S., MEIER, F., BONERT, A., MÜLLER-SPAHN, F. et ECKERT, A. (2009). Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(6-7), 1063-1071.
20. SPUCH, C., ORTOLANO, S. et NAVARRO, C. (2012). New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Journal of Aging Research*, 324968.
21. STEINBACH, JP., MÜLLER, U., LEIST, M., LI, ZW., NICOTERA, P. et AGUZZI, A. (1998). Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death & Differentiation*, 5(10), 858-866.

22. KOIKE, MA., LIN, AJ., PHAM, J., NGUYEN, E., YEH, JJ., RAHIMIAN, R., TROMBERG, BJ., CHOI, B., GREEN, KN. et LAFERLA, FM. (2012). APP knockout mice experience acute mortality as the result of ischemia. *PLoS One*, 7(8), e42665.
23. FITZJOHN, SM., MORTON, RA., KUENZI, F., DAVIES, CH., SEABROOK, GR. et COLLINGRIDGE, GL. (2000). Similar levels of long-term potentiation in amyloid precursor protein -null and wild-type mice in the CA1 region of picrotoxin treated slices. *Neuroscience Letters*, 288(1), 9-12.
24. LINDE, CI., BARYSHNIKOV, SG., MAZZOCCO-SPEZZIA, A. et GOLOVINA, VA. (2011). Dysregulation of Ca²⁺ signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein. *Cell Physiology: American Journal of Physiology*, 300(6), C1502-1512.
25. MASLIAH, E., RABER, J., ALFORD, M., MALLORY, M., MATTSON, MP., YANG, D., WONG, D. et MUCKE, L. (1998). Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12548-12554.
26. DAWSON GR, SEABROOK GR, ZHENG H, SMITH DW, GRAHAM S, O'DOWD G, BOWERY BJ, BOYCE S, TRUMBAUER ME, CHEN HY, VAN DER PLOEG LH, SIRINATHSINGHJI DJ. (1999). 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), 1-13.
27. SEABROOK, GR., SMITH, DW., BOWERY, BJ., EASTER, A., REYNOLDS, T., FITZJOHN, SM., MORTON, RA., ZHENG, H., DAWSON, GR., SIRINATHSINGHJI, DJ., DAVIES, CH., COLLINGRIDGE, GL. et HILL, RG. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, 38(3), 349-359.
28. SENECHAL, Y., KELLY, PH. et DEV, KK.. (2008). Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behavioural Brain Research*, 186(1), 126-132.
29. SHI, J., XIANG, Y. et SIMPKINS, JW. (1997). Hypoglycemia enhances the expression of mRNA encoding beta-amyloid precursor protein in rat primary cortical astroglial cells. *Brain research*, 772(1-2), 247-251.
30. BEN KHALIFA, N., TYTECA, D., MARINANGELI, C., DEPUYDT, M., COLLET, JF., COURTOY, PJ., RENAULD, JC., CONSTANTINESCU, S., OCTAVE, JN. et KIENLEN-CAMPARD, P. (2012). Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *The FASEB Journal*, 26(2), 855-867.
31. CHUA, LM., LIM, ML. et WONG, BS. (2013). The Kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(4), 642-647.
32. HSIA, O. KK., BORCHELT, DR., OLSON, K., JOHANNSDOTTIR, R., KITT, C., YUNIS, W., XU, S., ECKMAN, C., YOUNKIN, S., PRICE, D., Iadecola, C., Clark, H. et Carlson, G. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*, 15(5), 1203-1218.
33. KREZOWSKI, J., KNUDSON, D., EBELING, C., PITSTICK, R., GIRI, RK., SCHENK, D., WESTAWAY, D., YOUNKIN, L., YOUNKIN, SG., ASHE, KH. et CARLSON, GA. (2004). Identification of loci determining susceptibility to the lethal effects of amyloid precursor protein transgene overexpression. *Human Molecular Genetics*, 13(18), 1989-1997.
34. MA, H., LESNÉ, S., KOTILINEK, L., STEIDL-NICHOLS, JV., SHERMAN, M., YOUNKIN, L., YOUNKIN, S., FORSTER, C., SERGEANT, N., DELACOURTE, A., VASSAR, R., CITRON, M., KOFUJI, P., BOLAND, LM. et ASHE, KH. (2007). Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8167-8172.
35. LI, S., MALLORY, M., ALFORD, M., TANAKA, S. et MASLIAH, E. (1997). Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(8), 901-911.

36. MASLIAH, E., ALFORD, M., MALLORY, M., ROCKENSTEIN, E., MOECHARS, D. et VAN LEUVEN, F. (2000). Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Experimental Neurology*, 163(2), 381-387.
37. TAMAYEV, R., MATSUDA, S., GILIBERTO, L., ARANCIO, O. et D'ADAMIO, L. (2011). APP heterozygosity averts memory deficit in knockin mice expressing the Danish dementia BRI2 mutant. *The EMBO journal*, 30(12), 2501-2509.
38. TAMAYEV, R. et D'ADAMIO, L. (2012). Memory deficits of British dementia knock-in mice are prevented by A β -precursor protein haploinsufficiency. *Journal of Neuroscience*, 32(16), 5481-5485.
39. TRUSHINA, E., DUTTA, T., PERSSON, XM., MIELKE, MM. et PETERSEN, RC. (2013). Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. *PLoS One*, 8(5), e63644.
40. WALLS, AB., EYJOLFSSON, EM., SMELAND, OB., NILSEN, LH., SCHOUSBOE, I., SCHOUSBOE, A., SONNEWALD, U. et WAAGEPETERSEN, HS. (2011). Knockout of GAD65 has major impact on synaptic GABA synthesized from astrocyte-derived glutamine. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(2), 494-503.
41. HEBER, S., HERMS, J., GAJIC, V., HAINFELLNER, J., AGUZZI, A., RÜLICHE, T., VON, KRETZSCHMAR, H., VON KOCH, C., SISODIA, S., TREMML, P., LIPP, HP., WOLFER, DP. et MÜLLER, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7951-7963.
42. KORTE, M., HERRMANN, U., ZHANG, X. et DRAGUHN, A. (2012). The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. *Experimental Brain Research*, 217(3-4), 435-440.
43. NEEDHAM, BE., WLODEK, ME., CICCOTOSTO, GD., FAM, BC., MASTERS, CL., PROIETTO, J., ANDRIKOPOULOS, S. et CAPPAL, R. (2008). Identification of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) and its homologue APLP2 as essential modulators of glucose and insulin homeostasis and growth. *The Journal of Pathology*, 215(2), 155-163.
44. SMOAK, IW. (1993). Embryopathic effects of the oral hypoglycemic agent chlorpropamide in cultured mouse embryos. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 169(2 Pt 1), 409-414.

2. RAPPORT D'ACTIVITÉS CONCERNANT LA PREMIÈRE ANNÉE DU DOCTORAT

UNIQUEMENT POUR LES CANDIDATS À UNE 1^{RE} BOURSE - 2^E ANNÉE

3. DESCRIPTION DE L'ENVIRONNEMENT DE TRAVAIL

Le laboratoire de Neurosciences, dirigé par le promoteur principal depuis 2012, étudie les mécanismes de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Il dispose de quatre postes expérimentaux complets permettant de réaliser des enregistrements extra- et intracellulaires sur des tranches d'hippocampe maintenues artificiellement en vie. Il dispose de tout le matériel nécessaire à la confection des tranches ainsi que des étireuses programmables pour la confection d'électrodes en verre. Il possède également un local réservé à la culture cellulaire équipé d'un microscope à fluorescence adapté pour les mesures de calcium intracellulaire. Le service compte parmi ses membres un technicien électronicien spécialisé dans les mesures électrophysiologiques et une assistante de recherche, Paula Paci, responsable des cultures.

Le Prof. Ris a obtenu au cours de ces dix dernières années des fonds qui ont permis l'équipement des salles d'électrophysiologie (axoclamp and axopatch amplifiers, stimulators, pressure injector, micropipette pullers, gene gun transfection system, fear conditioning system, patch clamp 3D manipulator, digital camera for microscope). Elle a également participé aux demandes de crédits permettant l'achat d'un microscope confocal et d'un spectromètre de masse auxquels le service peut avoir accès.

Le service de Neurosciences est intégré dans l'Institut de Recherche des Biosciences de l'UMONS qui regroupe une vingtaine de services dans les différents domaines des Biosciences. Ce regroupement facilite les collaborations et l'exploitation du matériel de recherche disponible à l'UMONS.

Diverses collaborations établies par le service pourraient être profitables au développement de ce projet de recherches :

- La collaboration entamée avec le laboratoire du Dr. Rouach (Collège de France, Paris) à l'occasion du séjour post-doctoral d'Agnès Villers permettra d'installer d'ici peu la technique du « patch-clamp » sur tranches d'hippocampe murin. Cette dernière me permettra de mener à bien l'étude de l'activité des transporteurs et des canaux potassiques sur les tranches d'hippocampe.
- Les travaux portant sur l'activité des transporteurs glutamatergiques seront réalisés au sein du laboratoire de neuropharmacologie du Prof. Emmanuel Hermans (UCL, Bruxelles).
- Les études de métabonomique nécessaires au bon déroulement de ce projet seront réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Jean-Marie Colet (Service de biologie humaine et toxicologie, UMONS, Mons).
- Le laboratoire collabore depuis de nombreuses années avec le Dr. Ilse Dewachter du laboratoire du Prof. Jean-Noël Octave (Institute of Neuroscience, UCL, Bruxelles) sur l'étude de la maladie d'Alzheimer sur des souris transgéniques. Certaines techniques de biologie moléculaire seront réalisées au sein de l'Institut.
- La technique de microdialyse me sera enseignée au sein du laboratoire de Neurologie expérimentale du professeur Mario Manto (ULB, Bruxelles).

Enfin, l'université de Mons dispose d'une animalerie au sein de laquelle je gèrerai les naissances de mes modèles expérimentaux.

4. RÉSUMÉ DU MÉMOIRE DE MASTER OU ÉQUIVALENT

La dérégulation du métabolisme du glucose affecte tout particulièrement les neurones puisque ceux-ci utilisent majoritairement ce monosaccharide pour maintenir leurs diverses fonctions métaboliques. L'hypoglycémie, causant une déplétion en ATP, produit alors des effets dramatiques au niveau du système nerveux central et plus particulièrement au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Ces effets comprennent une diminution de l'activité des réseaux neuronaux, une altération de la plasticité synaptique et une accumulation extracellulaire de glutamate menant à l'apparition de phénomènes excitotoxiques aboutissant à la mort neuronale.

Les effets de l'hypoglycémie sur le métabolisme général de la cellule neuronale sont quantifiés indirectement grâce à des enregistrements électrophysiologiques de la transmission et de la plasticité synaptiques que présentent des tranches aiguës d'hippocampe de souris B6.129S7 sauvages et « knock-out » pour le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde : l'APP.

Les résultats de cette étude suggèrent que l'APP, probablement par son domaine intracellulaire C_t (AICD), inhibe le métabolisme général des neurones pyramidaux en interférant de manière indirecte avec l'internalisation du glucose. L'éventuel effet délétère de l'APP ne semble se révéler qu'en condition hypoglycémique car une concentration physiologique de glucose permet de maintenir une activité métabolique suffisante. L'APP augmenterait la sensibilité des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe vis-à-vis de l'hypoglycémie. Ceci se traduit indirectement par une excitabilité neuronale réduite, une viabilité cellulaire compromise et une potentialisation à long terme altérée.

Le clivage protéolytique de l'APP étant progressivement dérégulé dans la maladie d'Alzheimer, la quantité de peptides amyloïdes et d'AICD produite augmente avec l'aggravation de la maladie. Cette pathologie est connue pour présenter une détérioration progressive des fonctions mnésiques et cognitives provenant d'une altération de la plasticité synaptique. Une meilleure évaluation du rôle de l'APP dans le métabolisme, en dehors du rôle du peptide amyloïde, pourrait permettre d'avancer dans la compréhension de la pathologie.

5. COMMENTAIRES ADDITIONNELS (OPTIONNEL)

6. CALENDRIER MENSUEL DES TRAVAUX DE DOCTORAT

