



I- Introducció

El temps que passa actua sobre tots els organismes vius. Així, l'home no s'escapa de l'envelliment. Amb la millora de les condicions de vida en els nostres països occidentals, la longevitat ha augmentat. El nombre de persones de més de 80 anys esdevé cada vegada més important. En paral·lel, el nombre de persones afectades per les patologies associades a l'envelliment esdevé considerable. Sobretot les malalties neurodegeneratives que provoquen discapacitats severes i pèrdua d'autonomia com la malaltia d'Alzheimer. És una veritable aposta de la societat a escala científica, social i econòmica. És, doncs, molt important comprendre millor els mecanismes biològics implicats en l'envelliment normal i el patològic. No obstant això, les dades actuals mostren que els processos implicats són molt complexos (Kirkwood, 2008). Actualment hi ha un consens sobre certs mecanismes moleculars que generen progressivament danys moleculars i cel·lulars com la producció de radicals lliures, els danys del DNA, agregació de les proteïnes... Els esdeveniments identificats condueixen a afectacions principalment del DNA, del metabolisme energètic, control de la supervivència cel·lular. L'envelliment cerebral segueix el curs comú a l'envelliment cel·lular però presenta també especificitats pròpies. Notablement, s'ha demostrat una modificació de la plasticitat sinàptica amb la senectud (Hof et Morrison, 2004) que modifica les capacitats de memoritzar (Burke et Brnaes, 2006; Kelly et al., 2006). Els estudis transcriptòmics permeten tenir una apreciació del conjunt de les modificacions de l'expressió dels gens en el còrtex frontal (Lu et al., 2004; Fraser et al., 2005) o en el cos callós, molt ric en mielina (Duce et al., 2008).

Per aquests estudis sobre els mecanismes cel·lulars i moleculars, és necessari disposar de models animals. Els animals clàssics de laboratori, les rates i els ratolins,

Gina Devau Lenzi-Casal

Doctora en neurociències, investigadora i professora a la Universitat de Montpeller



Gina Devau Lenzi-Casal

Models animals en la recerca de la malaltia d'Alzheimer

Microcebus murinus: un model escaient per l'estudi transcriptòmic de l'envelliment cerebral

Nota:

recerca realitzada per Gina Devau^{1*}, Sabine Alves¹, Véronique Pantesco², John De Vos², Nadine Mestre-Francés¹, Jean-Michel Verdier¹.

1- Inserm U710-Universitat de Montpeller II-EPHE, Universitat de Montpeller II CC105, plaça Eugène Bataillon, 34095 Montpeller Cedex 05

2- IRB, Inserm U475, CHU St. Eloi, Montpeller

són ancians amb 2 anys, però les dades obtingudes no són sempre transposables directament a l'home. Els primats no humans són filogenèticament més propers a l'home, però són ancians després de més de 20 anys. Nosaltres hem conduït el nostre estudi sobre un petit primat lemurià, *Microcebus murinus*. És un model intermedi que presenta nombrosos avantatges per estudiar l'envelliment (Bons et Rieger, 2006; Joly et al., 2006). Aquest animal té una durada de vida de 7 a 10 anys en captivitat i presenta similituts en les modificacions fisiològiques lligades a l'edat com l'home (Perret et Aujard, 2006). En el curs de l'envelliment, alguns animals (5%) presenten espontàniament plaques amiloides, signes característics de la malaltia d'Alzheimer (Mestre-Francés et al., 2000).

Un cert nombre de gens estan implicats en la malaltia d'Alzheimer (Tanzi, Neuron 2001). L'expressió d'un gran nombre de gens és modificada en el curs de l'envelliment o de la neurodegeneració com la malaltia d'Alzheimer. Actualment, els estudis transcriptòmics permeten seguir en paral·lel l'expressió de gens i de comparar-los entre els joves i els ancians o bé entre els ancians sans i els ancians portadors de plaques amiloides.

II- Mètodes i resultats

II-1. Els animals

En el nostre estudi, els animals són subministrats d'un centre de cria de laboratori respectant les normes europees d'ètica (European Community Council directive of 24 november 1986) amb l'acreditació 34.134 de la direcció departamental dels serveis veterinaris. Hem comparat 5 animals joves amb 9 animals ancians (figura 1 i taula 1).

Animals	Edat	Sexe	A β IR
52	11 mesos	F	A β -
984	11 mesos	F	A β -
986	11 mesos	F	A β -
985	12 mesos	M	A β -
954	13 mesos	M	A β -
916	3 anys i 2 mesos	M	A β -
921	8 anys i 7 mesos	M	A β -
901	8 anys	M	A β -
8	7 anys i 6 mesos	F	A β -
42	7 anys i 6 mesos	F	A β -
43	8 anys i 6 mesos	F	A β -
906	14 anys i 9 mesos	F	A β -
896	12 anys i 4 mesos	F	A β +
973	8 anys i 4 mesos	F	A β +

Taula 1



Figura 1 *Microcebus murinus*

La presència de plaques amiloides en el còrtex cerebral és detectada amb un anticòs policlonal de conill anti-Abeta FCA 3542 (1:1000, Calbiochem). Les reaccions d'immunocitoquímica són realitzades sobre talls sagitals de l'hemisferi dret (figura 2).

Les plaques estan constituïdes per agregats de proteïnes A-beta immunoreactives amb l'anticòs Anti-A-beta dirigit contra el pèptid 1-42.

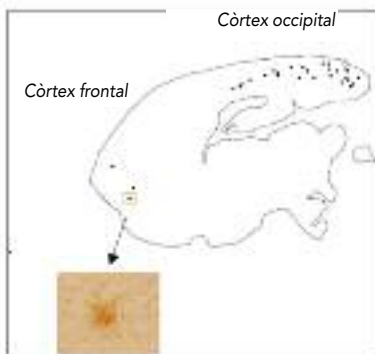


Figura 2 Detecció de plaques amiloides en el còrtex cerebral de *Microcebus murinus* 973.

II-2. Transcriptoma del còrtex temporal

Els RNA són extrets del còrtex temporal de l'hemisferi esquerre dels animals (kit RNeasy Qiagen). La qualitat dels RNA és controlada (Bioanalyzer, Agilent).

Els RNA són transformats en RNAc per hibridar-se sobre dels esquers dels fragments de DNA. Són fragments de genoma humà Affymetrix U133 Plus2.0 contenenint 54 675 esquers. Després de la hibridació, la intensitat del senyal és detectat i enregistrarat per l'escaèner (Gene Chip 3000, Agilent). Les dades són aleshores tractades pel GCOS de l'estació Affymetrix.

II-3. Anàlisi de les dades transcriptòmiques

Detecció dels RNA presents en el còrtex temporal de *Microcebus*.

Taula 2. Nombre de gens expressats detectats en el còrtex temporal.

<u>Animals</u>	<u>Gens expressats "Presentes"</u>	<u>Affymetrix U133plus2.0</u>	<u>Humà</u>
	<u>Mitjana ± SD</u>	<u>%</u>	
<u>Tots</u>	7981,3 ± 1246,82	14,6 ± 2,23	
<u>Joves</u>	7686,4 ± 1091,26	14,1 ± 2,0	
<u>Ancians sans</u>	8338,3 ± 1505,22	15,2 ± 2,73	
<u>Ancians A-beta</u>	7469,5 ± 346,5	13,6 ± 0,7	

II-4. Anàlisi global de les dades

Les dades són triades primer, ja que els gens en què el RNA és absent en tots els animals són eliminats. Els gens detectats presents són aleshores classificats en funció del senyal d'intensitat d'hibridació. Els senyals són tractats amb el programa Cluster i Treeview (Eisen et al., 1998).

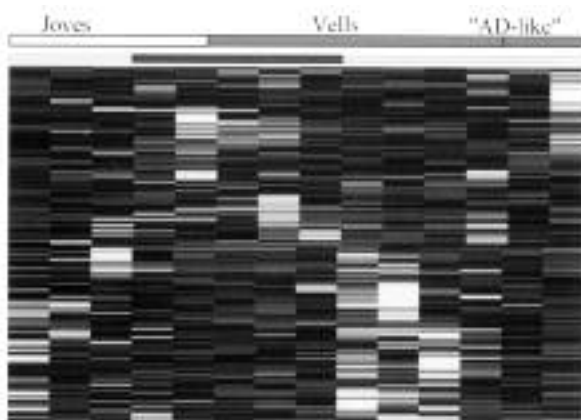
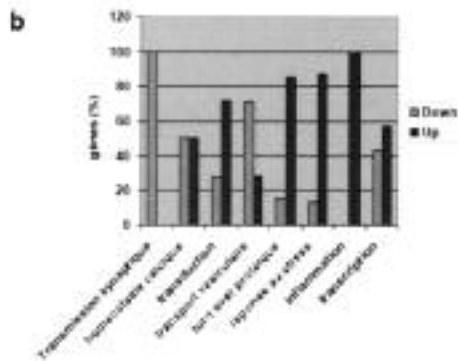
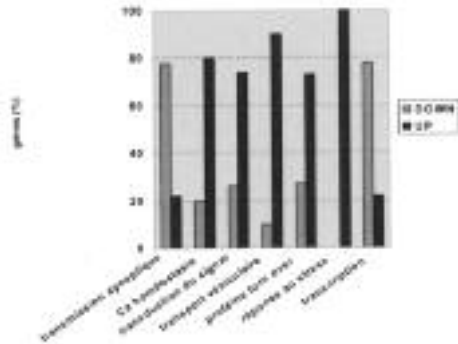


Figura 3. Classificació i reagrupament de les dades transcriptòmiques pels programes Cluster i Treeview. Cada columna correspon a un animal: les femelles (línia rosa) i els mascles (línia blava). Cada línia correspon a un gen. Per cada gen, els senyals són classificats en relació amb el valor mitjà. El color verd indica que la intensitat és inferior a la mitjana, el gen està subexpressat. El color vermell indica que la intensitat és superior a la mitjana, el gen està sobreexpressat. Els tres grups d'animals, joves, ancians i ancians amb plaques amiloïdes expressen perfils diferents.

II-5. Anàlisi modulars

Les dades seguidament són triades i classificades en funció de llurs activitats cel·lulars i de llurs implicacions en diferents mòduls funcionals. Els mòduls que han estat analitzats més particularment són els que intervenen en les vies de senyalització de la malaltia d'Alzheimer, el control de la supervivència o de la mort cel·lular (apoptosi), el control de danys i reparació del DNA, l'estrès oxidant, la inflamació i les citocines, els factors tròfics, les diferents vies de senyalització intracel·lulars i els factors de transcripció, la neurotransmissió amb més particularment la transmissió glutamat i GABA, el citoesquelet, les proteïnes de la matriu extracel·lular i les mol·lècules d'adhesió. Per cada mòdul, els gens són classificats i comparats en funció

de cada grup d'animals: joves, ancians o ancians amb plaques amiloides. Els gens diana són els que expres- sen una diferència d'expressió significativa en un grup en relació amb els altres grups. L'interval de canvi pres en consideració varia d'un factor multiplicatiu (-3) a (+3).



Els gens identificats en què l'expressió varia en el curs de l'envelliment o bé en les dades dels animals portadors de plaques amiloides són actualment controlades per diferents anàlisis estadístiques. Entre aquestes anàlisis, les variances entre els grups es comparen per l'Anova amb el programa "R". Els gens dels quals

l'expressió és significativa són reagrupats en una llista de gens interessants. Les variacions d'expressió d'aquests gens són en curs de validació per PCR quantitatiu (*real time PCR*).

Aquestes anàlisis permeten, doncs, construir una llista de gens en què l'expressió serà modificada en el decurs de l'envelliment o per la neurodegeneració. Nosaltres assagem de determinar els lligams biològics i fisiològics entre aquests diferents gens utilitzant els diferents *pathways* coneguts utilitzant els programes apropiats (Ingenuity, Agilent) o de banc de dades com Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

IV- Discussió

Els nostres resultats mostren que el nombre de gens detectats com a expressats en el còrtex cerebral del *Microcebus murinus* és coherent amb els resultats obtinguts per altres primats no humans amb els microxips de DNA *Affymetrix* humans de nombroses generacions (Marmanova *et al.*, 2003; Khaitovitch *et al.*, 2004; Duce *et al.*, 2008). Per tant, el nostre model lemurià és pertinent per prosseguir el nostre estudi transcriptòmic sobre l'envelliment cerebral. Podem, doncs, comparar l'expressió dels gens entre animals joves i ancians sans.

Els primers estudis han estat portats recentment a l'home o a d'altres grans primats no humans, però el nombre de mostres roman restringit (Lu *et al.*, 2004; Fraser *et al.*, 2005; Duce *et al.*, 2008). Les recerques en aquest domini han de ser desenvolupades i consolidades. La identificació dels gens que estan implicats en els processos d'envelliment ha de permetre establir un perfil d'expressió específic diferent del d'un envelliment normal.

El nostre model lemurià presenta l'avantage de ser un model natural de la malaltia de tipus Alzheimer. En efecte, alguns individus ancians desenvolupen de

Referències bibliogràfiques

- Blalock, E. M.; Geddes, J. W.; Chen, K. C.; Porter, N. M.; Markesbery, W. R.; Landfield, P. W. (2004) "Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2173-2178.
- Bons, N.; Rieger, F. (2006) "*Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease". *Genes Brain Behav.* 5 (2), 120-130.
- Burke, S. N.; Barnes, C. A. (2006) "Neural plasticity in the ageing brain". *Nature Rev Neurosci.* 7, 30-40.
- Duce, J. A.; Podvin, S.; Hollander, W.; Kipling, D.; Rosene, D.; Abraham, C. R. (2008) "Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the Rhesus monkey". *Glia* 56, 106-117.
- Eisen, M. B.; Spellman, P. T.; Brown, P. O.; Botstein, D. (1998) "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14863-14868.
- Fraser, H. B.; Khaitovitch, P.; Plotkin, J. B.; Pääbo, S.; Eisen, M. B. (2005) "Aging and gene expression in the primate brain". *PLoS Biol.* 3, e274, 1653-1661.
- Hof, P. R.; Morrison, J. H. (2004) "The aging brain: Morphomolecular senescence of cortical circuits". *Trends Neurosci.* 27, 607-613.
- Joly, M.; Deputte, B.; Verdier, J. M. (2006) "Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, *Microcebus murinus*". *Neurobiol. Aging* 27, 1045-9.
- Kelly, K. M.; Nadon, N. L.; Morrison, J. H.; Thibault, O.; Barnes, C. A.; Blalock, E. M. (2006) "The neurobiology of aging". *Epilepsy Res.* 68S, S5-S20.
- Khaitovitch, P.; Muetzel, B.; She Xinwei; Lachmann, M. *et al.* (2004) "Regional patterns of gene expression in Human and Chimpanzee Brains". *Genome Res.* 14, 1462-1473.

- Kirkwood, T. B. L. (2008) "A systematic look at an old problem". *Nature*, 451/7, 644-647.
- Lu, T.; Pan, Y.; Kao, S.-Y.; Li, C.; Kohane, I.; Chan, J.; Yankner, B. A. (2004) "Gene regulation and DNA damage in the ageing brain". *Nature* 429, 883-891.
- Marvanova, M.; Menager, J.; Bezard, E.; Bontrop, R. E.; Pradier, L.; Wong, G. (2003) "Microarray analysis of nonhuman primates: validation of experimental models in neurological disorders". *FASEB J.*, 17(8), 929-931.
- Mattson, M. P. (2004) "Pathways towards and away from Alzheimer's disease". *Nature* 430, 631-639.
- Mestre-Frances, N.; Keller, E.; Calenda, A.; Barelli, H.; Checler, F.; Bons, N. (2000) "Immunohistochemical analysis of cerebral cortical and vascular lesions in the primate *Microcebus murinus* reveal distinct amyloid beta 1-42 and beta 1-40 immunoreactivity profiles". *Neurobiol Dis.* 7, 1-8.
- Perret, M.; Aujard, F. (2006) "Aging and biological rhythms in primates". *Med. Sci. (Paris)* 22, 279-283.

forma natural la formació de plaques amiloides mentre que en els models de rates i ratolins, la formació de les plaques ha de ser induït. Hem mostrat un perfil d'expressió dels gens diferents entre els animals ancians sans i els portadors de plaques. Els mòduls en què observem les més fortes variacions d'expressió dels gens estan implicades en la transmissió sinàptica, en la senyalització de factors tròfics i les vies de senyalització intracel·lular (per a revisió, Mattson, 2004). Estem en curs d'identificació dels gens en què l'expressió està modificada significativament i els comparem amb les dades obtingudes en l'home (Blalock et al., 2004). Aquest estudi ha de permetre trobar els gens diana que encara no han estat identificats.