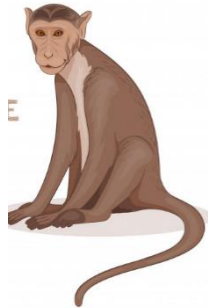
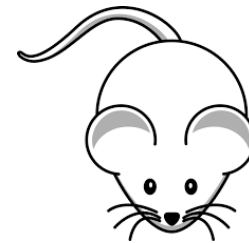
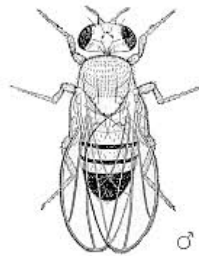


# Modèles animaux

N Mestre-Francés, Pr EPHE



# **Définition du modèle animal**

---

**En recherche biomédicale un modèle animal permet:**

- L'étude des données de référence sur la biologie ou le comportement**
- L'étude d'un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales**

## **Rôles précis des organismes modèles**

**Organisme exemplaire**: sert un but de connaissance qui vaut pour sa propre espèce mais aussi pour d'autres (animal pris comme modèle de pathologie, modèle E Coli a permis de découvrir le code génétique quasi universel)

**Organisme outil**: utiliser l'animal comme champ d'essai pour des interventions diverses (criblage de molécules en phase préclinique)

# Objectifs

---

**Recours limité aux études sur l'homme**

**Légalité**

**Raison d'éthique**

**Nécessité de modèles animaux**

**Besoin d'investigations plus poussées dans des conditions de laboratoire contrôlées**

**Recherche des mécanismes physiopathologiques**

**Essais de nouvelles méthodes diagnostiques ou thérapeutiques**

# Qu'est ce qu'un bon modèle animal?

---

L'analogie d'un modèle animal avec la pathologie humaine correspondante doit satisfaire aux critères suivants : Symptômes, Mécanismes, Traitements, Causes

## ➤ **Symptômes: Modèle isomorphique**

Le modèle animal doit présenter des symptômes identiques avec ceux de la pathologie humaine compte tenu des différences anatomiques, physiologiques..

## ➤ **Mécanismes: Modèle homologue**

La connaissance initiale (souvent faible) des mécanismes de la pathologie permet une comparaison qui s'affine avec l'utilisation du modèle (et donc une meilleure connaissance des mécanismes)

➤ **Traitements: Modèle prédictif:**

**Si l'on dispose de pharmaceutiques dont on connaît l'effet sur la pathologie humaine , le modèle animal doit également y répondre de la même manière.**

➤ **Causes**

**les causes de la pathologie humaine n'étant pas toujours connues ( exemple maladies neurodégénératives) la comparaison est souvent délicate et l'analogie difficile à établir**

# Historique

---

1905	Koch	Vache, mouton	origine et développement de la tuberculose
1919	Bordet	Cobaye, cheval	mécanismes de l'immunité
1932	Sherrington, Adrian	Chien, chat	fonction des neurones
1938	Heymans	Chien	mécanismes de régulation de la respiration
1945	Fleming, Chain, Florey	Souris	découverte de la pénicilline et de son effet thérapeutique
1964	Block, Lynen	Rat	régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras
1974	de Duve, Palade, Claude	poulet, cobaye, rat	organisation structurale et fonctionnelle de la cellule
1997	Prusiner	souris, hamster	découverte des prions, nouveau principe biologique d'infection
1998	Furchgott, Ignarro, Murad	Lapin	régulation de la tension artérielle par l'oxyde nitrique (NO)
2000	Carlsson, Kandel Greengard	Souris	fonctionnement du cerveau et mécanisme de la maladie de Parkinson
2002	Brenner, Horvitz Sulston	Ver	génétique du développement des organes
2006	Fire, Mello	ver	mécanisme de l'ARN interférence

# Principaux modèles animaux

---



***Caenorhabditis elegans***  
Apoptose, développement,  
neurologie



***Gallus gallus***  
Développement



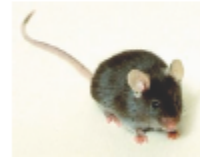
***Drosophila melanogaster***  
Génétique, organogenèse,  
oncogenèse



***Rattus norvegicus***  
Développement, physiologie,  
comportement, neurologie,  
oncogenèse...



***Danio rerio***  
organogenèse, oncogenèse



***Mus musculus***  
Développement, physiologie,  
neurologie, oncogenèse,  
génétique...



***Xenopus tropicalis***  
Développement



**Macaque**  
Comportement,  
pharmacologie...

# Classification

---

**Modèles naturels (spontanés)**

**Modèles expérimentaux**

**Modèles génétiquement modifiés**

**Modèles négatifs**



# Modèles naturels

---

**Conditions ou maladies présentent naturellement chez les animaux et identiques à des maladies ou affections humaines**

**Maladies ou affections souvent associées à des mutations naturelles conduisant à des désordres similaires à l'homme**

**Exemples:**

**Rat brattleboro: diabète insipide neurogène**

**Rat SHR: hypertension artérielle**

**Lapin Watanabe: hypercholestérolémie**

**Gerbilles atteintes d'épilepsie**

**Souris SCID: immunodéficiência combinée sévère**

# Modèles expérimentaux

---

**Modèles chez lesquels on reproduit expérimentalement une affection ou une maladie**

**Organismes animaux normaux soumis à des actes chirurgicaux et /ou toute autre intervention (diète, administration de médicaments ou d'agents infectieux) susceptibles d'engendrer un état physiologique anormal**

**Exemple:**

**Chirurgie : hypertension rénale (uninéphrectomie)**

**Insuffisance cardiaque (ligature coronaire)**

**Administration de médicaments ou de substances chimiques:**

**Diabète de type I (streptozotocine)**

# Modèles génétiquement modifiés

---

**Modèles expérimentaux dont le code génétique a été manipulé pour provoquer la maladie à étudier**

**Ces modèles permettent l'étude du fondement génétique de certaines maladies, la susceptibilité ou la résistance à celles-ci,**

**Exemples:**

**Insertion d'un ADN étranger**

**Remplacement (modèle knock-in) ou neutralisation de certains gènes (knock out)**

# Modèles négatifs

---

**Modèles négatifs qui présente des résistances à une affection donnée et dont l'étude permet de comprendre les causes et les bases physiologiques de la résistance à la maladie.**

## **Exemples**

**Seules certaines espèce sont sensibles à certaines maladies infectieuses, les autres sont des modèles négatifs (lapin insensible à l'infection gonocoque ou aux maladies à prions)**

# Limites d'un modèle

---

**Causes de la pathologie humaine, voire du modèle animal, souvent inconnues**

**Analogie jamais parfaite (symptômes, réponses au traitements)**

**Intérêt de croiser les résultats obtenus à partir de plusieurs modèles?**

**Connaissance indispensable de la biologie comparée et de la pathologie comparée des différentes espèces d'animaux de laboratoire**

**anatomie**

**physiologie**

**Aspects techniques de l'élevage**

**Hébergement**

**médecine et chirurgie vétérinaire**

**anesthésie**

**techniques expérimentales**

# Choix d'un modèle animal

## REMPACEMENT

Solutions autres que l'emploi d'animaux ou utilisation d'animaux ayant une sensibilité moindre

## RÉDUCTION

Utilisation de modèles animaux appropriés en quantités suffisantes afin de réduire les variations et le nombre d'animaux requis

## RAFFINEMENT

Modification des procédés d'entretien ou d'expérimentation pour diminuer la douleur et la détresse et améliorer le bien-être de l'animal

Avant de choisir un modèle animal, le chercheur principal doit envisager des solutions de rechange à l'emploi d'animaux vivants (principe des Trois R)

Le chercheur doit envisager tous les facteurs lorsqu'il choisit le modèle animal approprié pour son expérimentation

# Aspect éthique de l'expérimentation animale

---

La règle des 3 R : Remplacer Réduire Raffiner



## **REEMPLACER :**

remplacer les animaux à sang chaud et vertébrés par des animaux de rang dit «inférieur» (insectes, microorganismes) ou par des cultures cellulaires ou encore par des modèles informatiques

**REDUIRE :** Limiter au minimum le nombre d'animaux pour réaliser une expérience

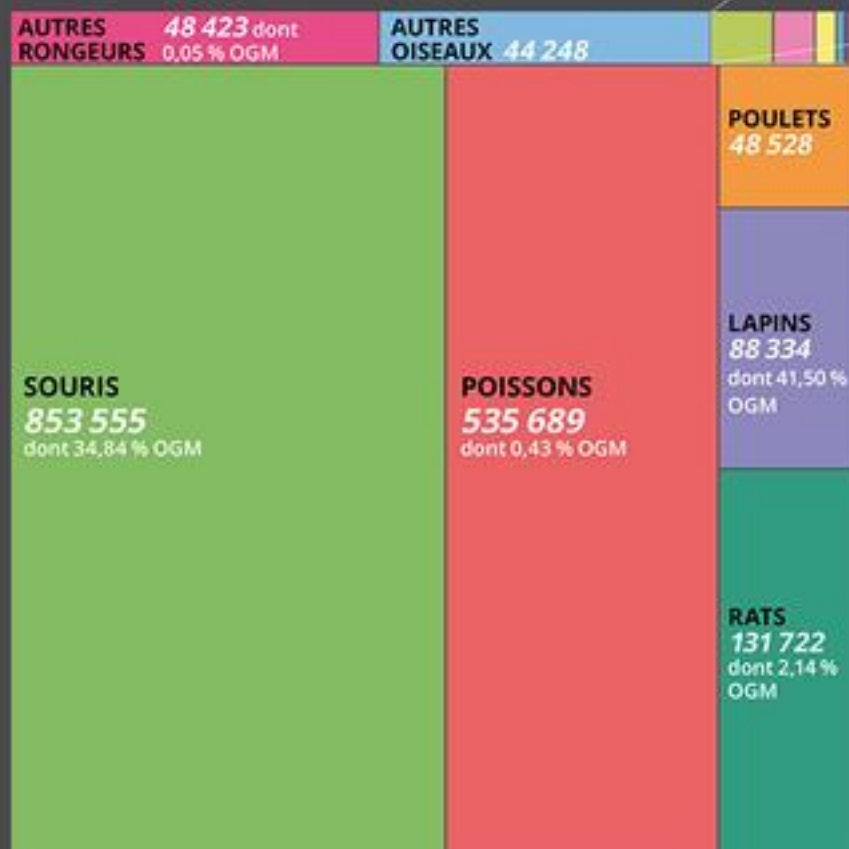
- en évitant de répéter des expériences déjà réalisées par d'autres (bibliographie)
- en travaillant en amont de l'expérience sur des substituts
- en mesurant simultanément un maximum de paramètres
- en utilisant le minimum d'animaux pour une statistique significative
- en s'appuyant sur le principe de remplacement

**RAFFINER** : diminuer la douleur et le stress autant que possible

- en utilisant avec justesse les anesthésiants
- en limitant les actes invasifs et en étant parfaitement formé aux techniques et soins vétérinaires



# Les espèces utilisées en France



Sur près d'1,77 million d'animaux\* utilisés dans des expériences terminées en 2014 en France, la souris est l'espèce la plus sollicitée (48,2 %), suivie des poissons (30,3 %), puis du rat (7,4 %) et du lapin (5 %).

Bien qu'ils soient systématiquement mis en avant par les « abolitionnistes », chats et chiens représentent ensemble moins de 0,2 % des animaux testés, et les primates 0,06 %.

Les animaux utilisés sont essentiellement nés dans l'Union européenne (97,2 %). Parmi eux, ceux qui ne proviennent pas d'établissements éleveurs ou fournisseurs agréés sont des animaux élevés au sein même de l'établissement utilisateur.

On note également que 19 % (340 000) des animaux utilisés à des fins scientifiques sont issus de lignées génétiquement altérées par différentes procédures : mutagenèse spontanée, aléatoire ou dirigée, transgénèse, etc. Cela concerne un peu plus d'un tiers des souris (34,8 %), près de la moitié des lapins (41,5 %), 2,7 % des chiens et un peu plus d'un rat sur 50 (2,1 %).

\* Les insectes ne font pas partie du champ de l'enquête.

Source : Enquête nationale 2014, ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

# Objet des études en France et sévérité des procédures

Source : Enquête nationale 2014, ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Cette enquête concerne les expériences terminées en 2014.

Les quatre degrés de gravité des procédures expérimentales sont définis en fonction de l'intensité de la douleur, du stress ou du dommage que l'animal risque de subir :

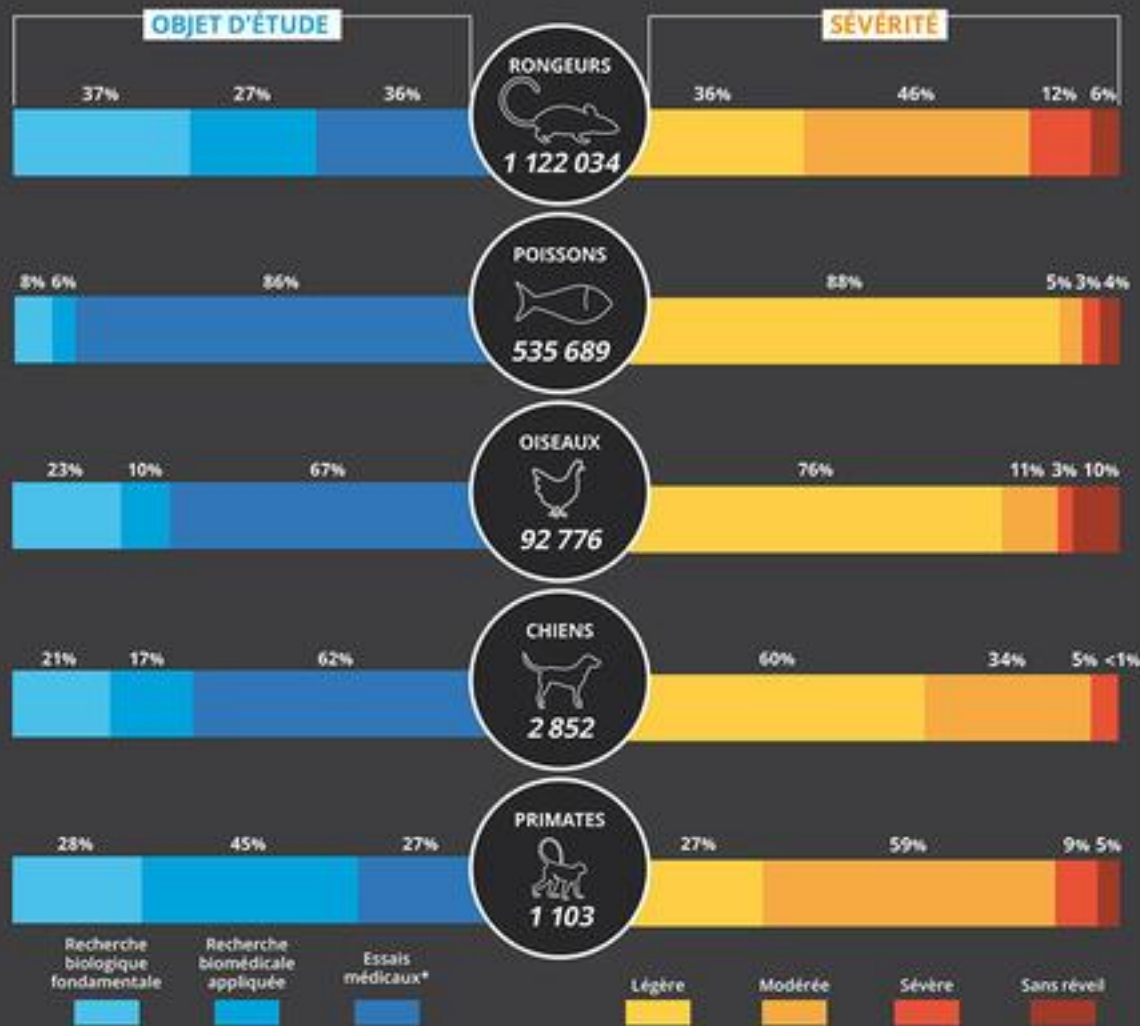
**Légère** : l'animal est susceptible d'éprouver une douleur ou une angoisse légère et de courte durée, sans incidence significative sur son état général.

**Modérée** : l'animal est susceptible d'éprouver une douleur ou une angoisse modérée ou de nature à avoir une incidence légère sur son état général.

**Sévère** : l'animal est susceptible d'éprouver une douleur ou une angoisse intense ou prolongée, de nature à avoir une incidence grave sur son état général.

**Sans réveil** : l'animal est anesthésié et ne reprend pas conscience à l'issue de la procédure.

\* Test cliniques (médicaments) et de toxicité des denrées alimentaires et des produits manufacturés.



# ***Choix du modèle animal***

---

Au sens large, la transgénèse est possible dans différentes espèces animales

- C. Elegans, Drosophile, Zebra fish, Xénope sont surtout utilisés pour étudier le développement, mais elles ont des limitations évidentes.

*Avantages:* développement rapide, outils génétiques puissants.

*Désavantages:* pas de technique d'inactivation, modèles moins transposables à l'homme.

- Les modèles mammifères (souris, rat et autre mammifères)

*Avantages:* avantage des modèles mammifères; inactivation génique

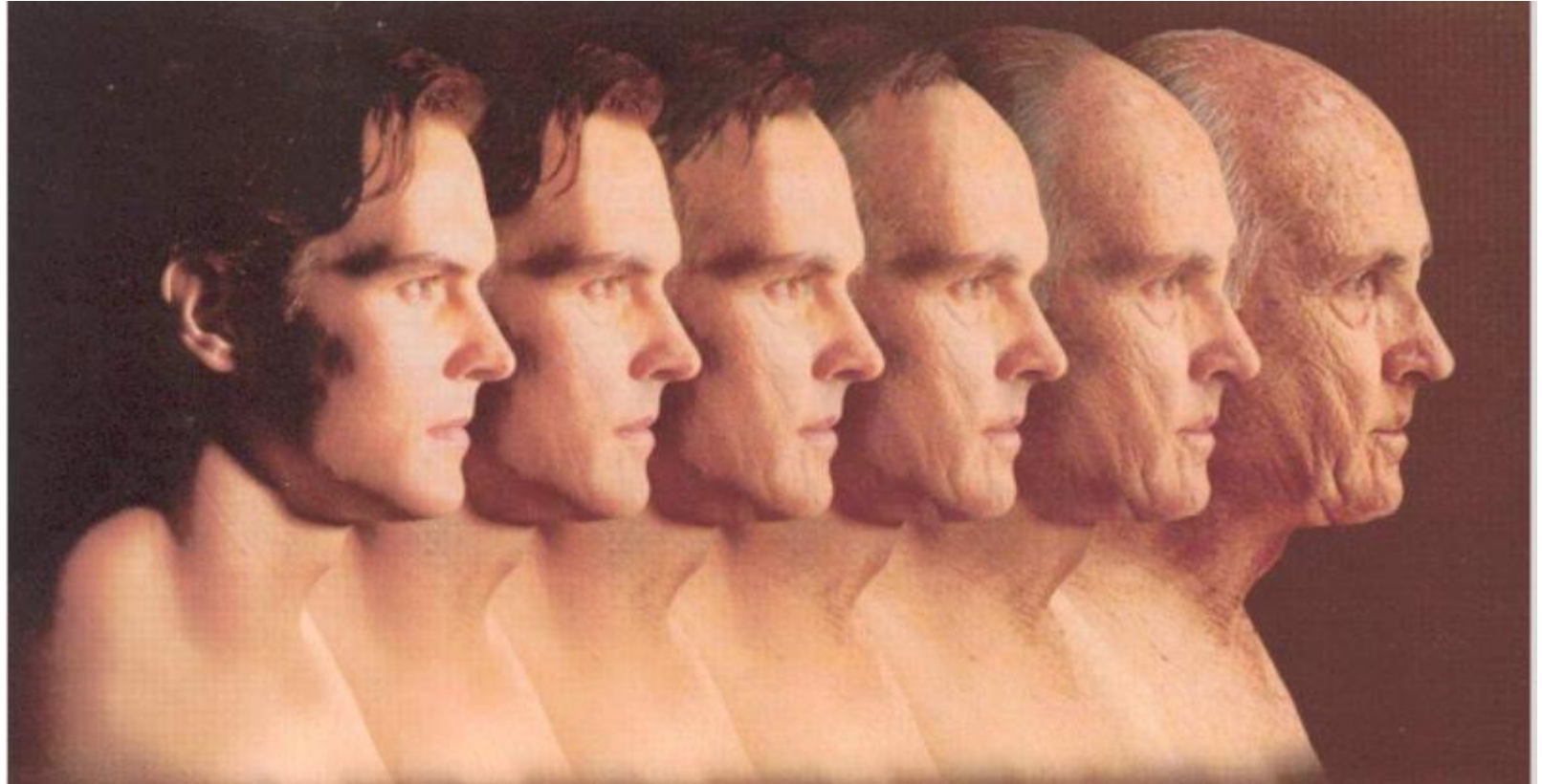
*Désavantages:* techniquement plus difficile d'accès, moins d'outils génétiques, développement plus lent.

**le choix de l'espèce dépend donc:**

1/ de la nature de la question posée;

2/ des avantages et des inconvénients de chaque modèle expérimental.

# Qu'est ce que le vieillissement?

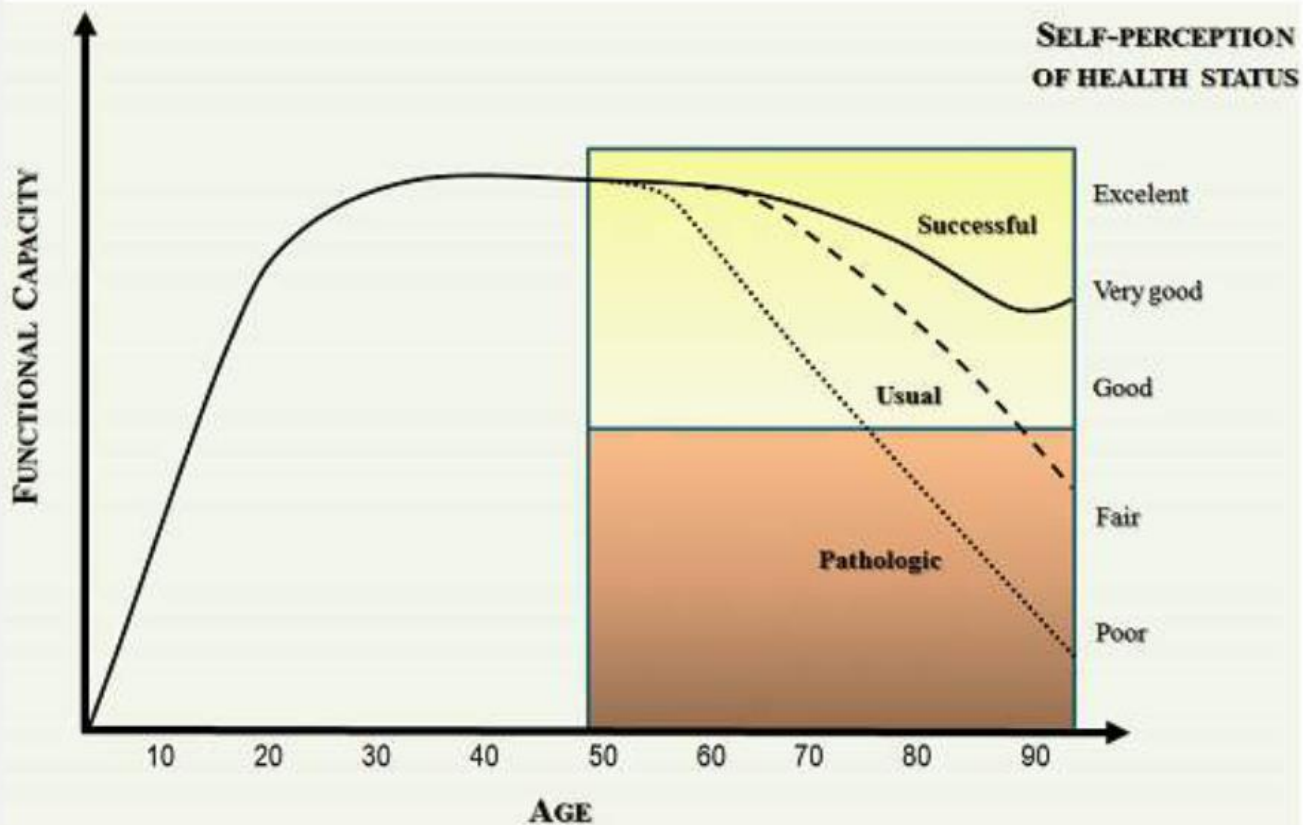


Le vieillissement désigne le processus selon lequel un organisme vivant évolue vers la mort.

Il se manifeste par un ensemble de modifications anatomiques, biologiques et physiologiques entraînant l'altération des fonctions propres de chaque structure



Le vieillissement est un des processus les plus complexes et sa définition est reliée de manière intrinsèque à son phénotype



Modified from Rowe JW, Gerontologist 1997

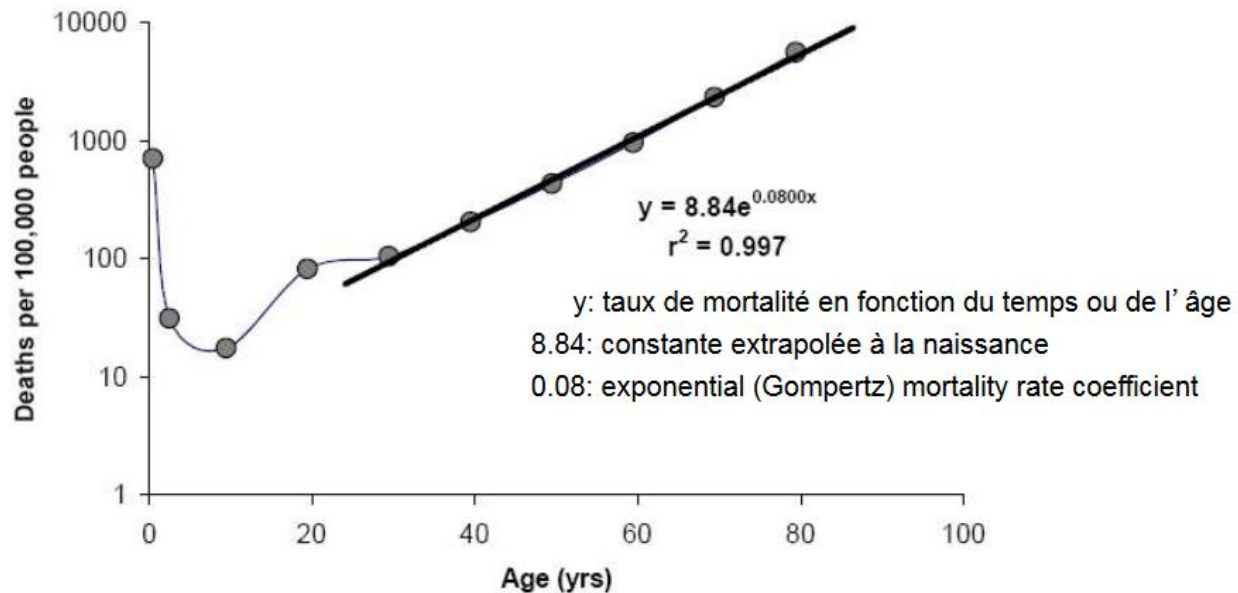


# Définitions

L'espérance de vie (durée de vie moyenne) représente l'âge moyen qu'un animal peut espérer vivre

Longévité et durée de vie maximum correspond au temps maximum qu'un animal d'une espèce donnée peut espérer vivre (record de longévité)

Une des constantes du vieillissement humain est l'augmentation avec l'âge du taux de mortalité



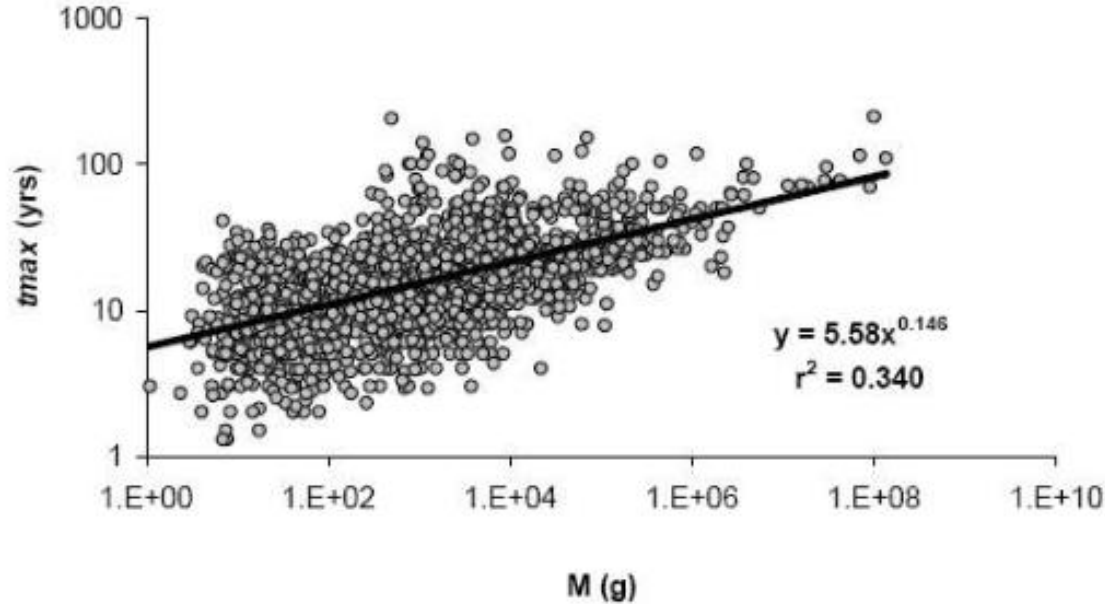
**Figure 1:** Mortality rates, expressed in deaths per 100,000 people, as a function of age for the 2002 US population. The black line represents the Gompertz function extrapolated from the mortality rates after maturity. Source: [CDC/NCHS, National Vital Statistics System, Mortality](#).



# Biologie comparative du vieillissement

---

- Différences importantes de longévité entre espèces
- Traits généraux et facteurs corrélant avec la longévité maximum
  - Longévité maximum représenterait le potentiel génétique de longévité de chaque espèce et est relié à la vitesse de vieillissement de chaque espèce



Un facteur qui corrèle avec la longévité maximum est la taille et ou masse du corps (idem pour la masse du cerveau) ,

Contraintes écologiques: En général, les petits animaux sont plus sensibles à la prédation et présentent un taux de mortalité extrinsèque élevé, une plus courte longévité maximum et un processus de vieillissement accéléré

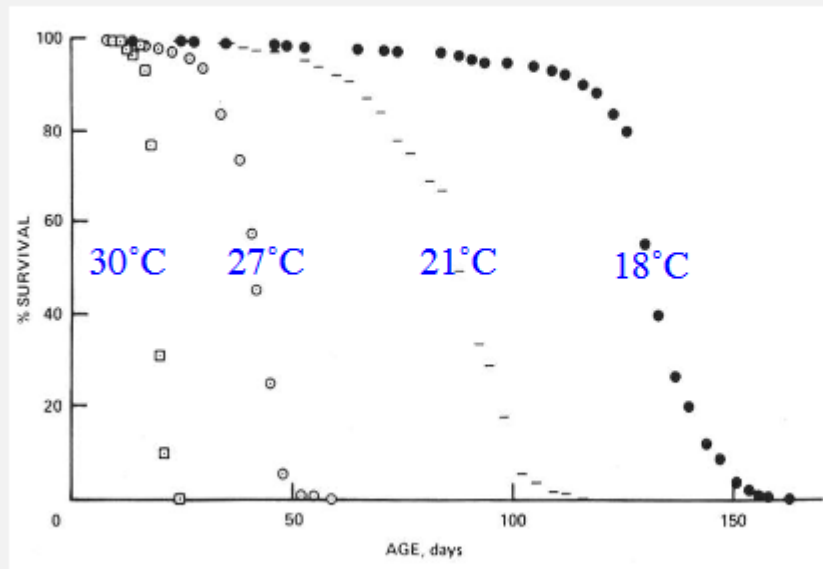
Exceptions telles que les chauves-souris (30 ans) et les oiseaux (Condor des Andes : 75 ans).



**Figure 6:** The little brown bat (*Myotis lucifugus*), despite its small size--they weight about 10 grams--[can live up to 34 years](#). Source: Don Pfritzer, [U.S. Fish and Wildlife Service](#).

Un autre facteur qui corrèlerait avec la longévité maximum est l'activité métabolique

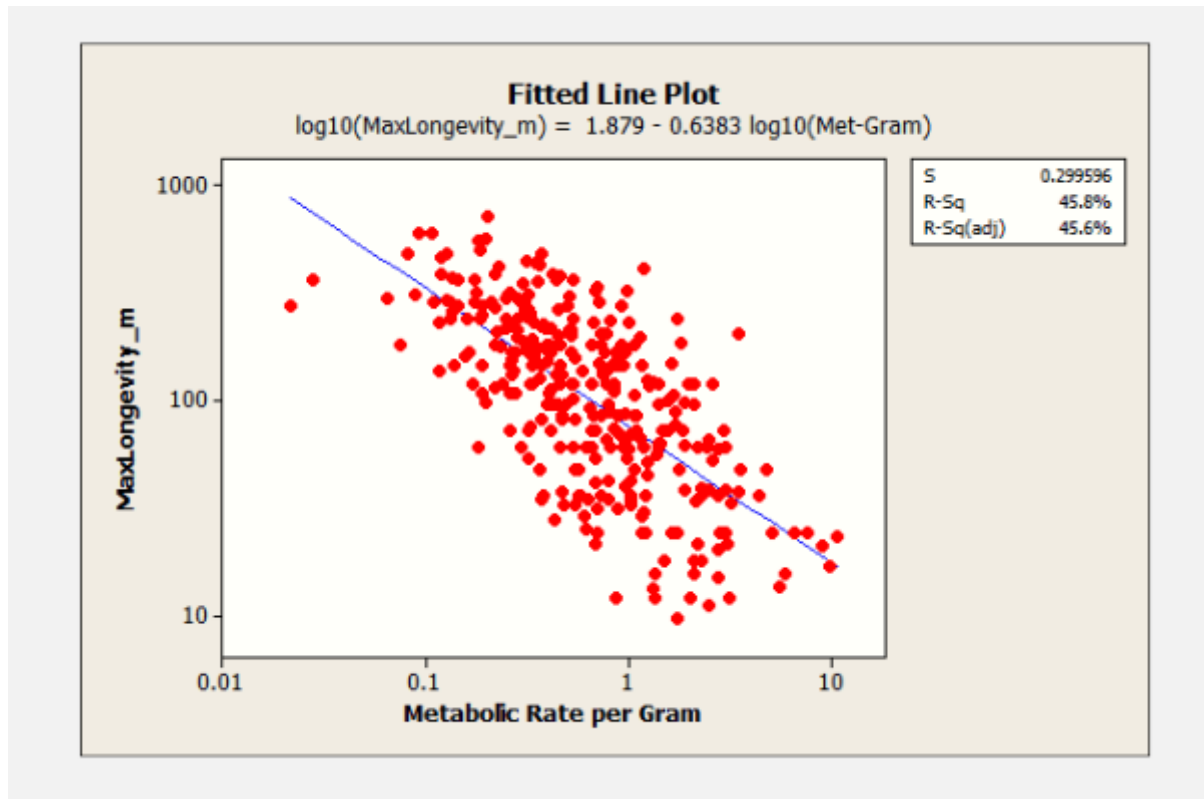
### The Rate-of-Living Theory (Raymond Pearl, 1928)



Effect of temperature on *Drosophila* lifespan

Loeb and Northrop (1916, 1917)

# longévité en fonction de l'activité métabolique



Reptiles et amphibiens ont des faibles activités métaboliques car ce sont des animaux à sang froid

138 ans

177 ans



**Figure 5:** Two examples of long-lived turtles that show no signs of aging. A: Eastern box turtle, which [can live up to 138 years](#). B: Galapagos tortoise, which [can live up to 177 years](#). Sources: Ryan Hagerty (A) and Paul Guther (B), [U.S. Fish and Wildlife Service](#).

- Un autre facteur qui corrèle avec la longévité maximum est le développement
- L'âge de la maturité sexuelle corrèle avec la longévité moyenne et maximum
- Pour des raisons évolutives les temps de déroulement du développement et du vieillissement seraient liés.

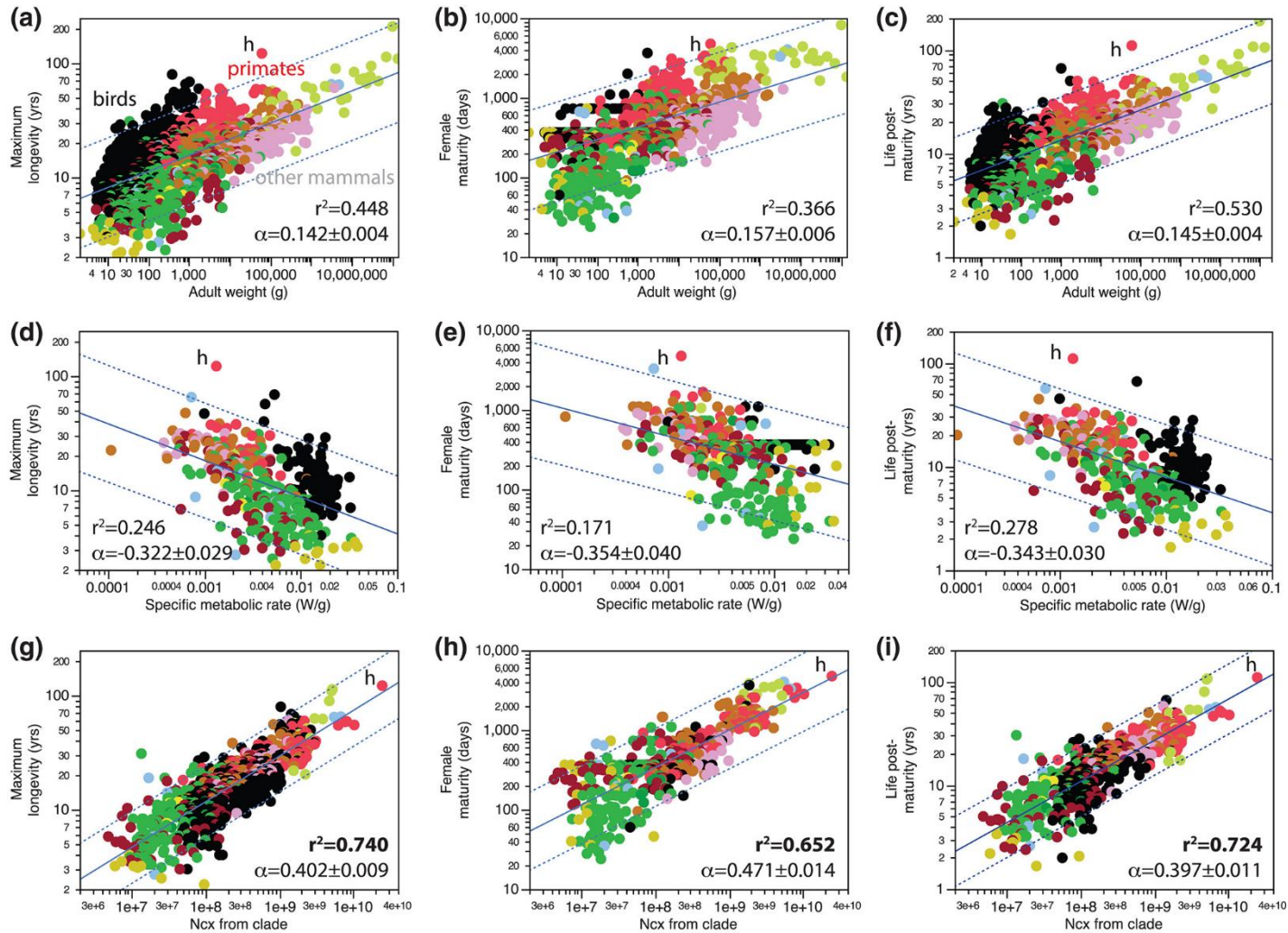
les animaux qui vivent longtemps se reproduisent tard, font peu de bébés et s'en occupent longtemps.

Une étude en 2019 a montré que c'est le nombre de neurones dans le cerveau qui détermine la longévité de l'individu et sa maturité sexuelle.

Longevity and sexual maturity vary accross species with number of cortical neurons and humans are no exception  
S. Herculano-Houzel *J. Comp. Neurol*, 2019

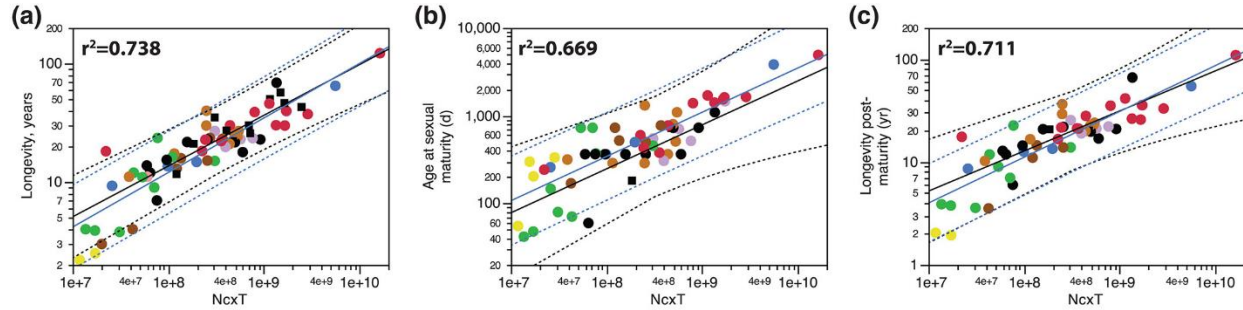


# Longévité maximale prédite par le nombre de neurones dans le cortex plutôt que par le poids ou le métabolisme

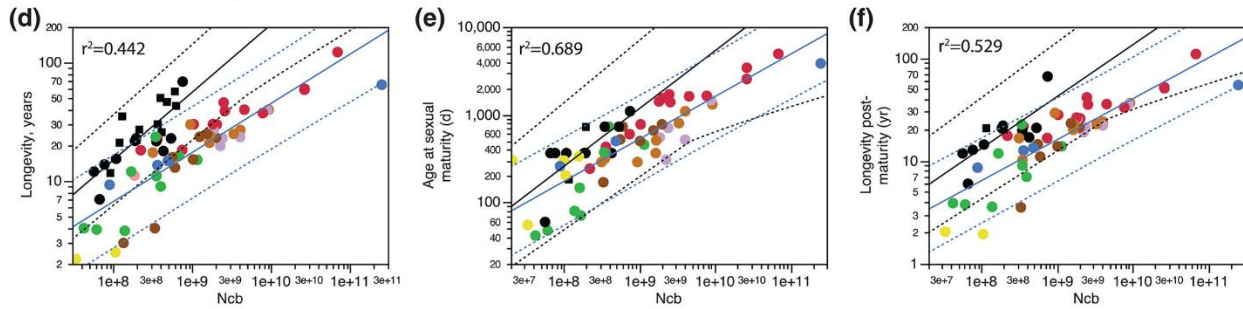


# Longévité maximale prédite par le nombre de neurones dans le cortex plutôt que dans d'autres structures cérébrales

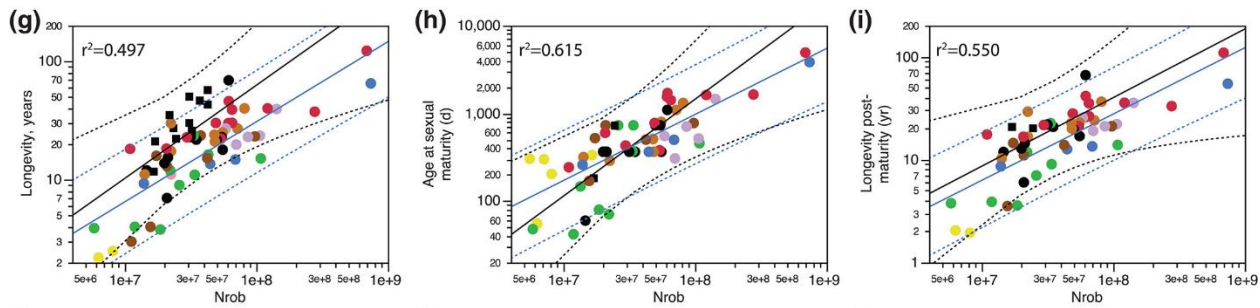
cortex



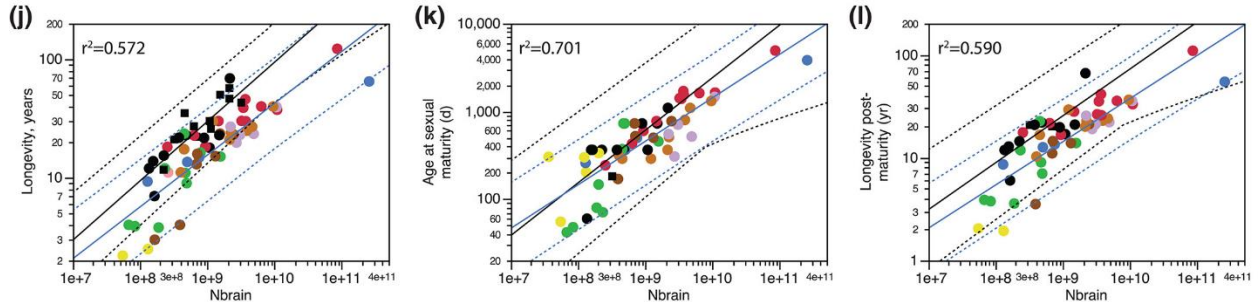
cervelet



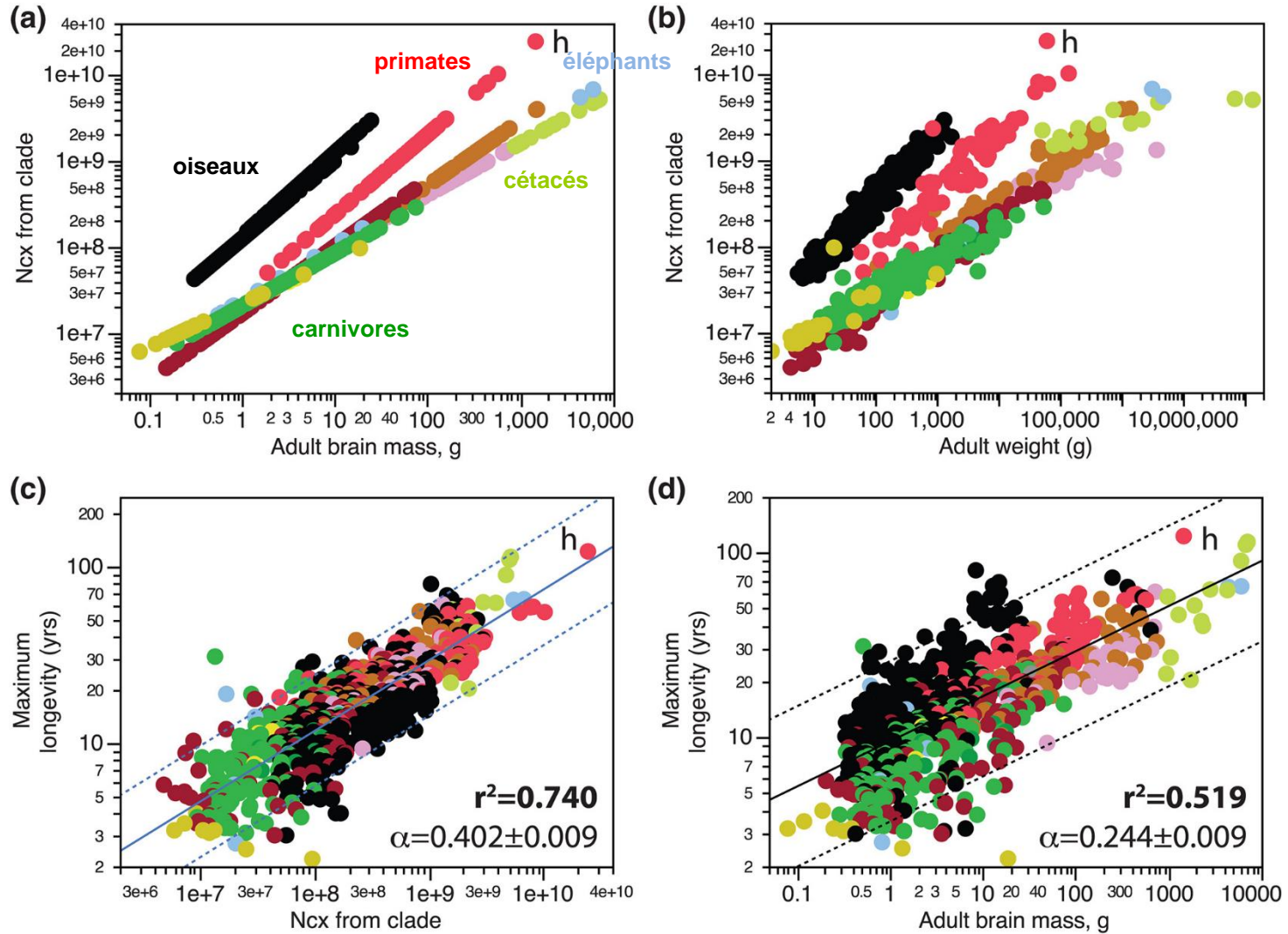
Autres structures



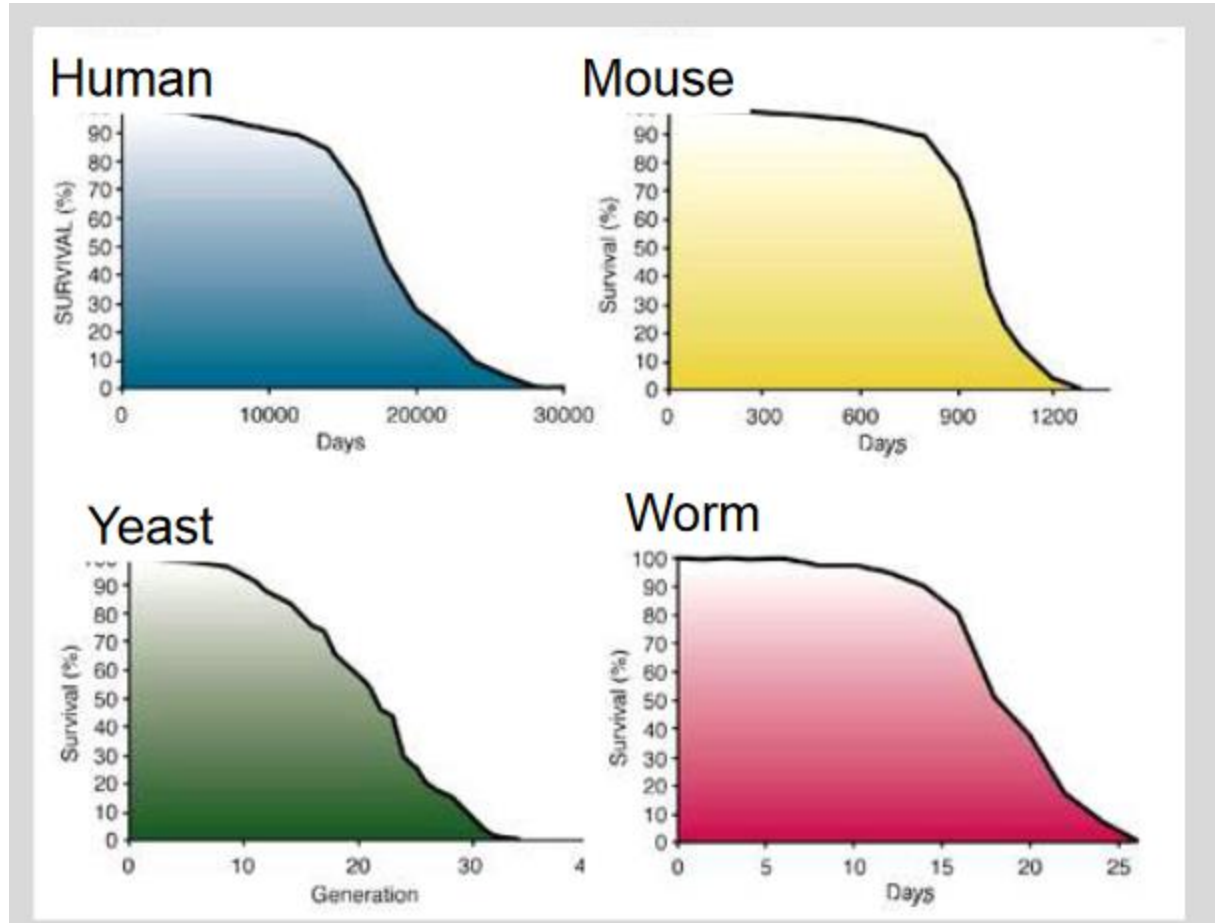
Cerveau entier



# Relation clade-spécifique entre le cerveau, la masse corporelle, nombre de neurones corticaux et la longévité maximale



# Taux de mortalité accru avec le temps





Both mice, who were non-mutants, were born the same week and raised in similar conditions. By their fourth birthday, they looked different. Blanche had a curved spine and tattered fur. Grace, whose black coat remained sleek, aged gracefully.



# Systemes les plus utilises pour l'etude du vieillissement

*Mus musculus*



*Drosophila Melanogaster*

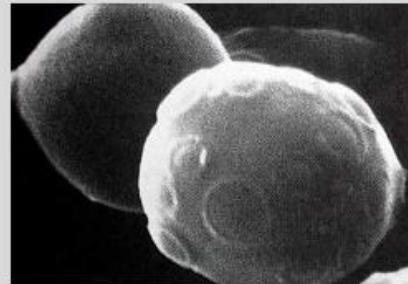


*Caenorhabditis elegans*



Organismes Unicellulaires

*Saccharomyces cerevisiae*



# Systemes modèles du vieillissement humain:

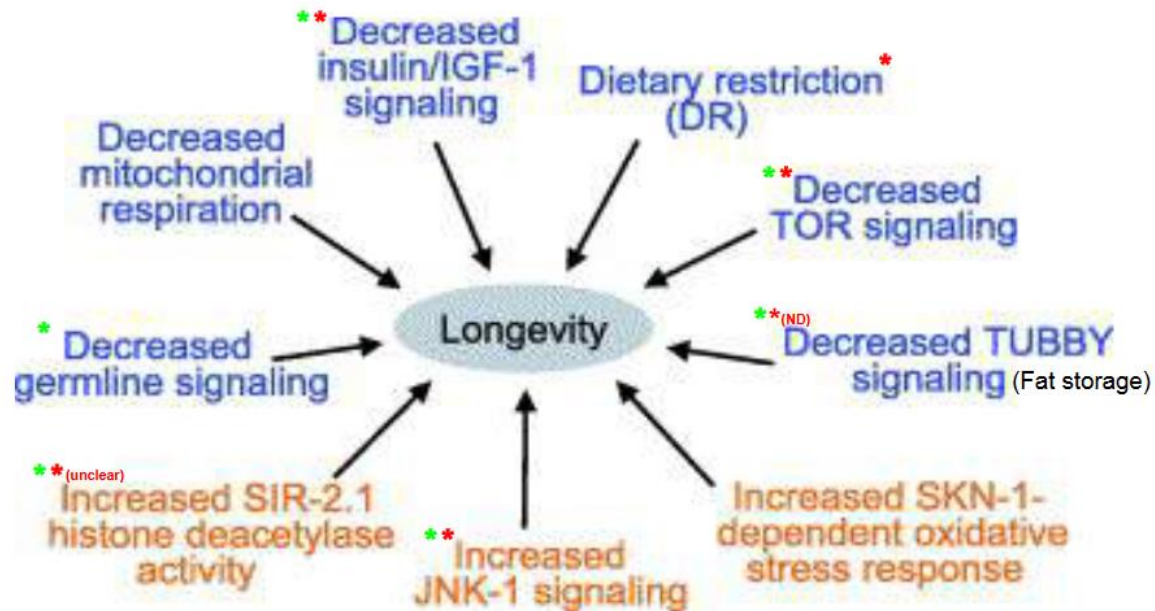
## Avantages

- Petite taille et court cycle de vie
- Faible coût
- Manipulations génétiques permettant de tester hypothèses
- Animaux consanguins

## Traits Communs

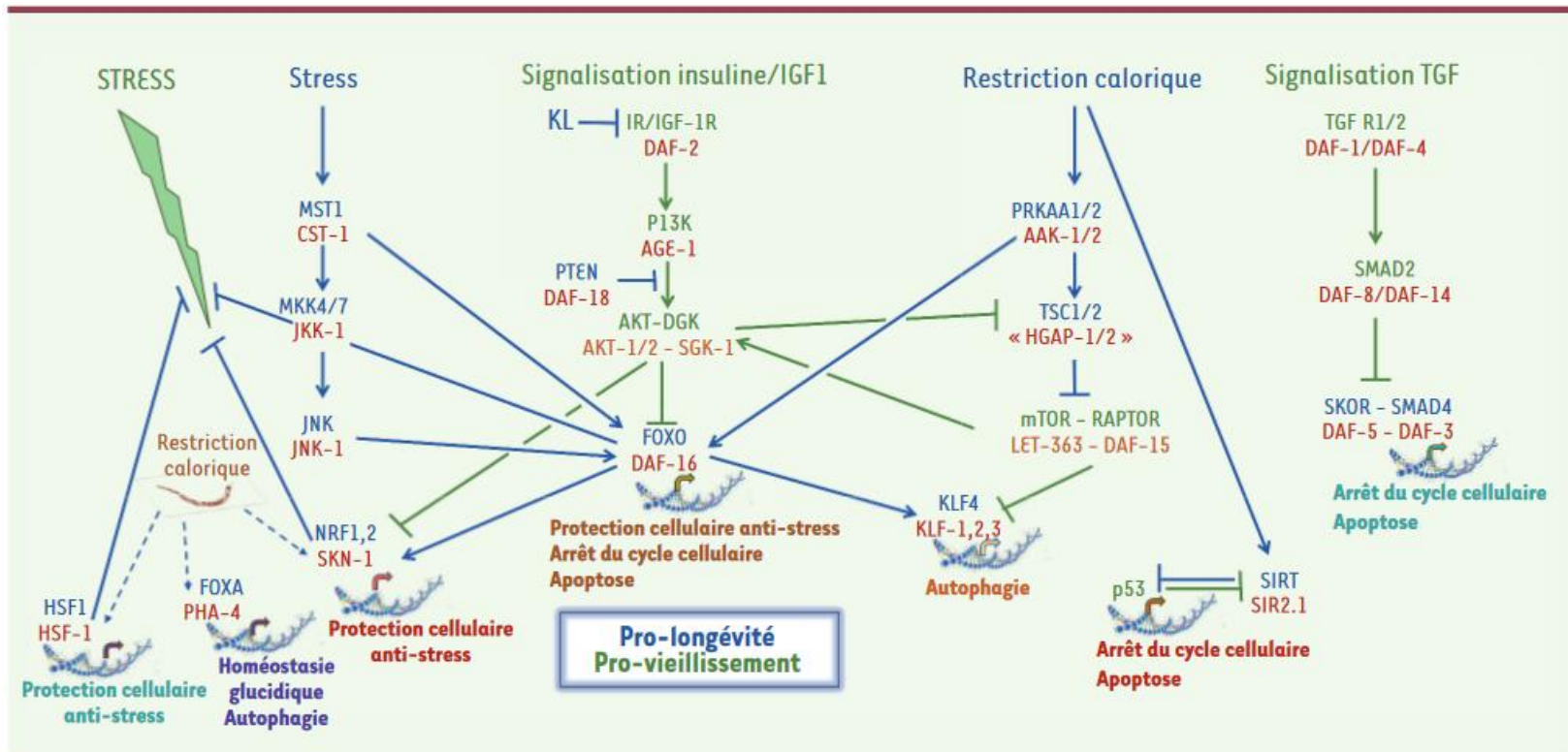
- Vieillessement : augmentation du taux de mortalité au fil du temps
- Diminution de la résistance au stress (organique et cellulaire)
- La fonction physiologique diminue avec l'âge.
- Maladies liées au vieillissement
- Changements cellulaires similaires dans les cellules vieillissantes

**Decreased activity** and **increased activity** of these signaling pathways and processes lead to longevity

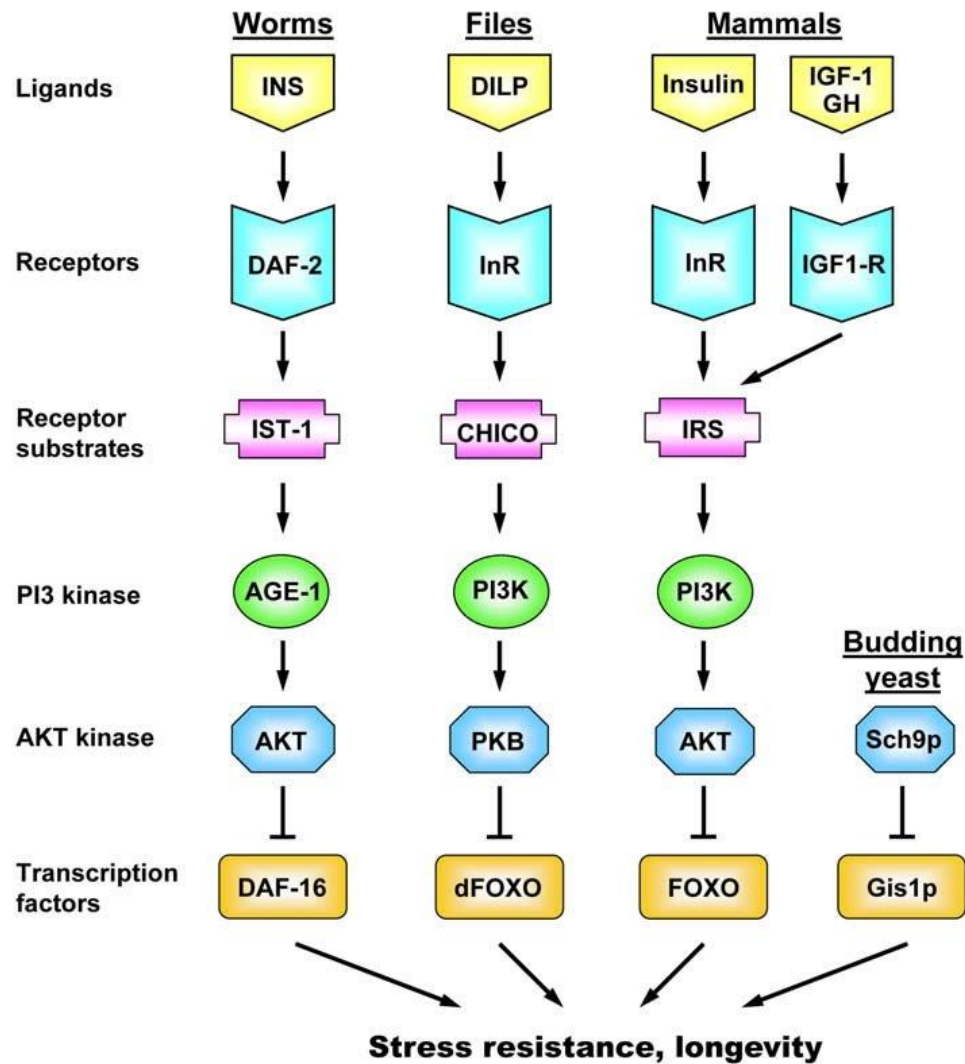


- \* Lifespan extension occurs in a DAF-16/FoxO-dependent manner (*C.elegans*).
- \* ” (*Drosophila*)

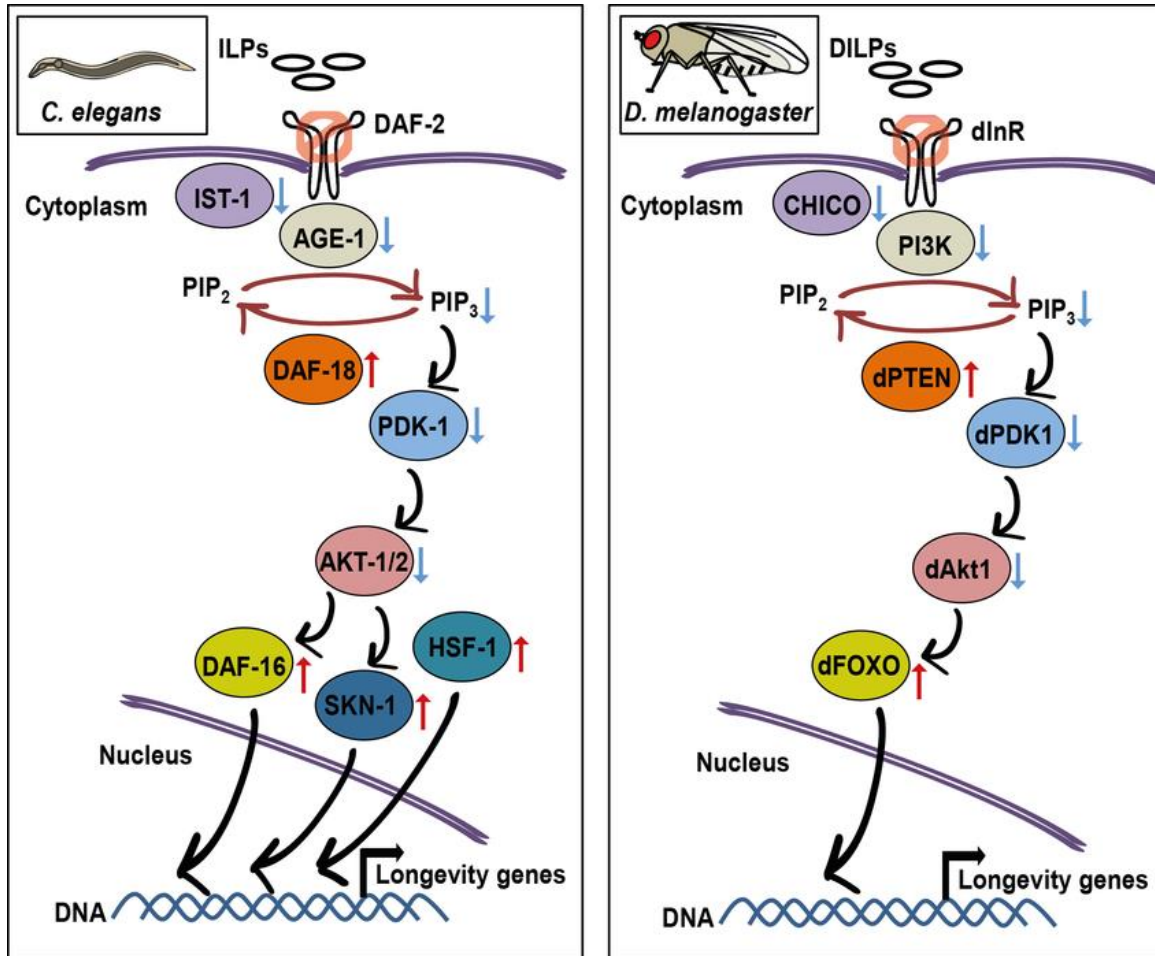




# Conservation de la voie insuline/ IGF1 régulant la longévité



# Insulin - IGF1 pathway



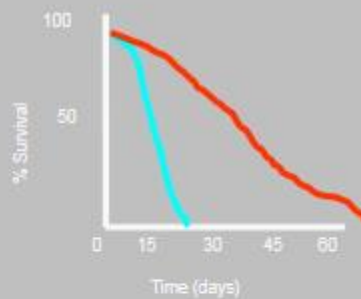
*Caenorhabditis  
elegans*



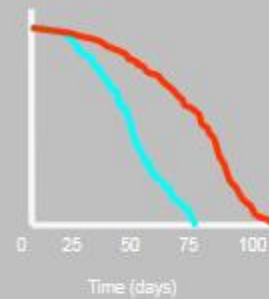
*Drosophila  
melanogaster*



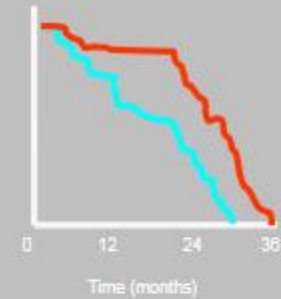
*Mus  
musculus*



Genotype Median lifespan  
wt ~15 days  
daf-2/daf-2 ~35 days



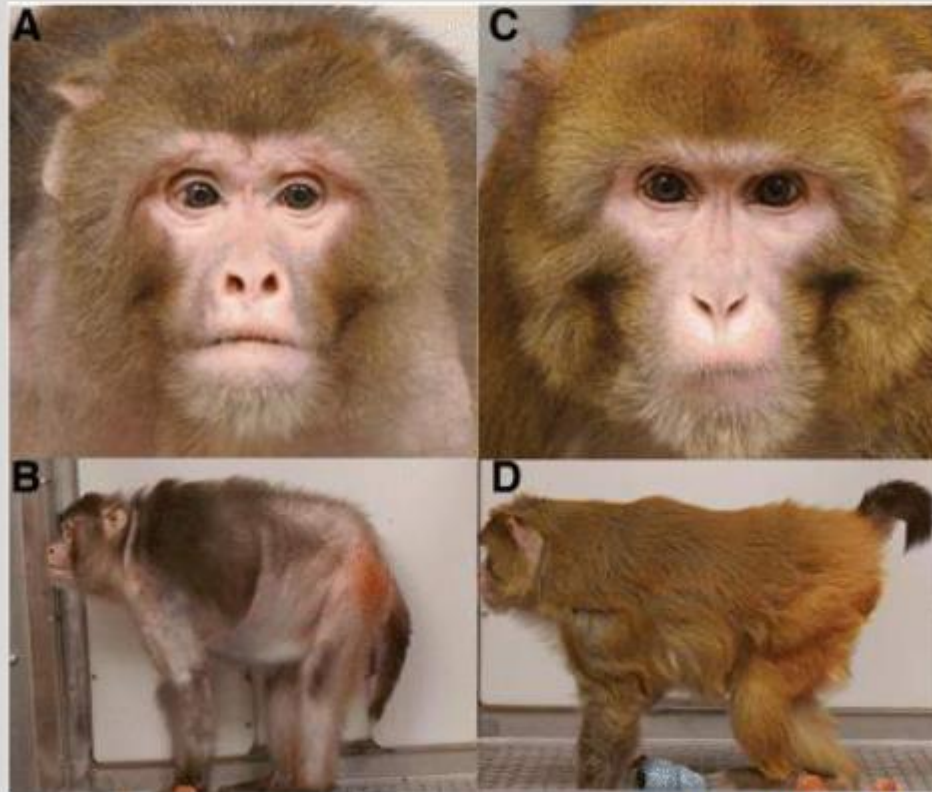
Genotype Median lifespan  
wt ~45 days  
chico/chico ~65 days









Genotype Median lifespan  
wt ~18.7 months  
Igf1r+/- ~24.9 months

- Reduced insulin / IGF-1 signalling
- Caloric restriction

La restriction calorique est la seule intervention non génétique connue à ce jour pour ralentir l'apparition de pathologies liées à l'âge et augmenter la durée de vie moyenne et maximale chez plusieurs espèces

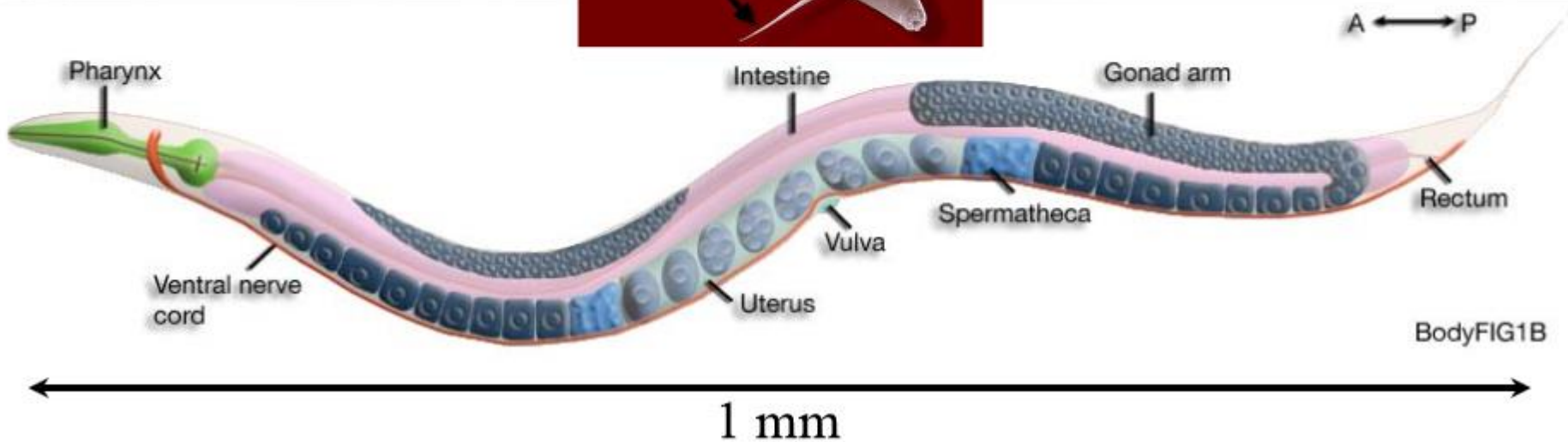


Colman Rj et al, Science 2009

		Life-span increase		Beneficial health effects	
		Dietary restriction	Mutations/ drugs	Dietary restriction	Mutations/ drugs
	<b>Yeast</b>	<b>3-fold</b>	<b>10-fold</b> (with starvation/ DR)	Extended reproductive period	Extended reproductive period, decreased DNA damage/mutations
	<b>Worms</b>	<b>2- to 3-fold</b>	<b>10-fold</b>	Resistance to misexpressed toxic proteins	Extended motility Resistance to mis-expressed toxic proteins and germ-line cancer
	<b>Flies</b>	<b>2-fold</b>	<b>60-70%</b>	None reported	Resistance to bacterial infection, extended ability to fly
	<b>Mice</b>	<b>30-50%</b>	<b>30-50%</b> (~100% in combination with DR)	Protection against cancer, diabetes, atherosclerosis, cardiomyopathy, autoimmune, kidney, and respiratory diseases; reduced neurodegeneration	Reduced tumor incidence; protection against age-dependent cognitive decline, cardiomyopathy, fatty liver and renal lesions, Extended insulin sensitivity
	<b>Monkeys</b>	<b>Trend noted</b>	<b>Not tested</b>	Prevention of obesity; protection against diabetes, cancer, and cardiovascular disease	<b>Not tested</b>
	<b>Humans</b>	<b>Not determined</b>	<b>Not determined</b> (GHR-deficient subjects reach old age)	Prevention of obesity, diabetes, hypertension Reduced risk factors for cancer and cardiovascular disease	Possible reduction in cancer and diabetes

# Anatomie de *C. elegans*

## L'hermaphrodite



# Avantages

## Facilités de manipulation

Culture sur boîte de pétri

Culture en milieu liquide

Possibilité de congeler des lignées (-70° à -100°C)

## Facilités pour l'analyse génétique

Autofécondation (hermaphrodites)

Croisement possible avec les males

Cycle de vie court

Génome séquencé

## Facilités d'observation

Petite taille (1 mm)

Corps transparent

Nombre de cellule invariable

## Facilité à obtenir des mutants

Mutagenèse

Micro-injection d'ADN

ARN interférence

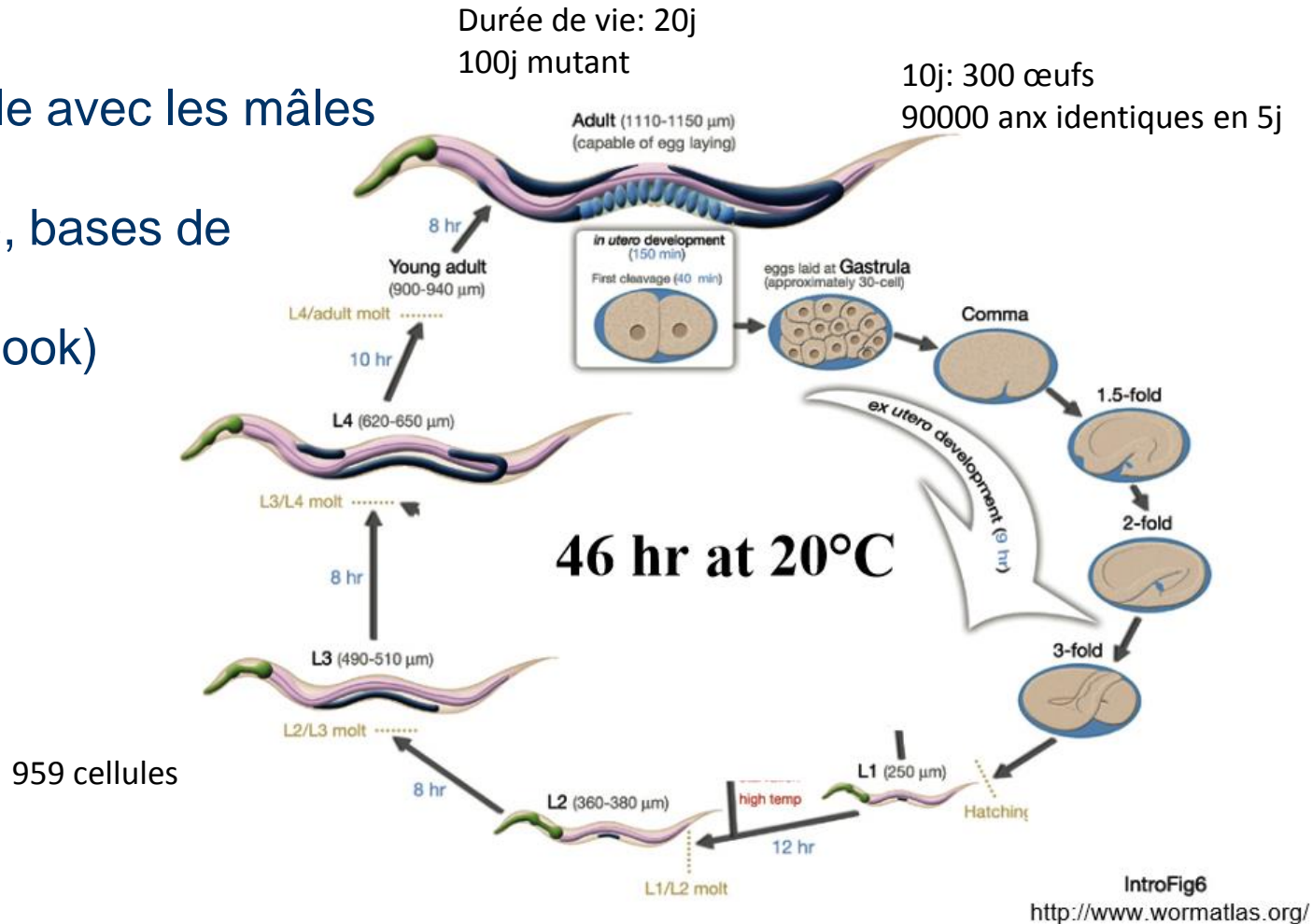


0.1 mm



# Facilité pour l'analyse génétique

Autofécondation  
Croisement possible avec les mâles  
Cycle de vie court  
Génome séquencé, bases de données  
(Wormbase, wormbook)



# Facilité d'observation

Petite taille (1 mm)

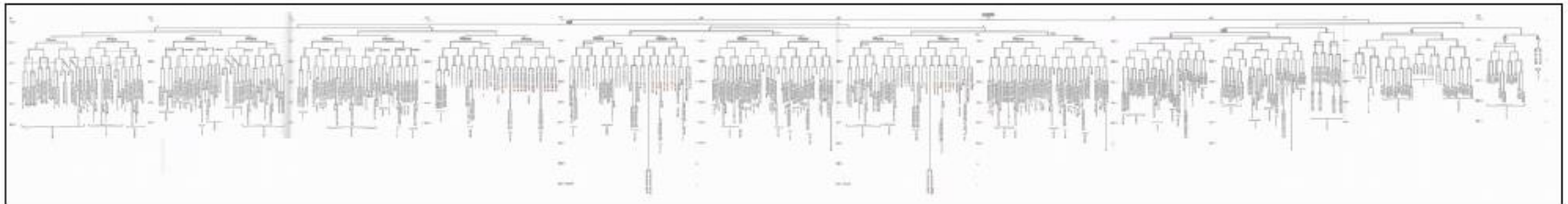
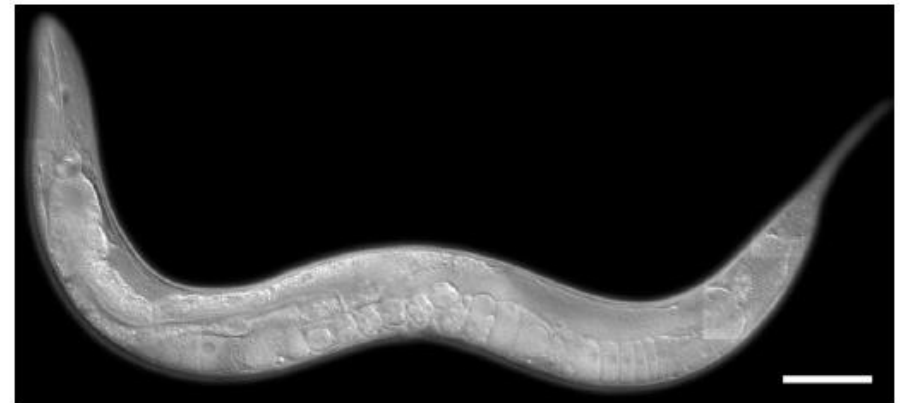
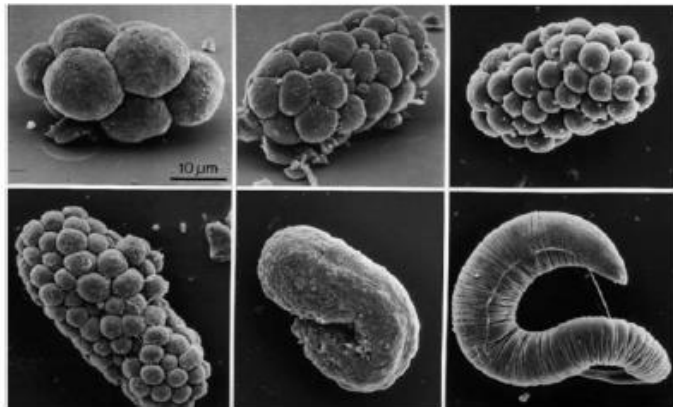
Corps transparent

Nombre de cellule invariable

959 cellules (hermaphrodite)

1031 cellules (male)

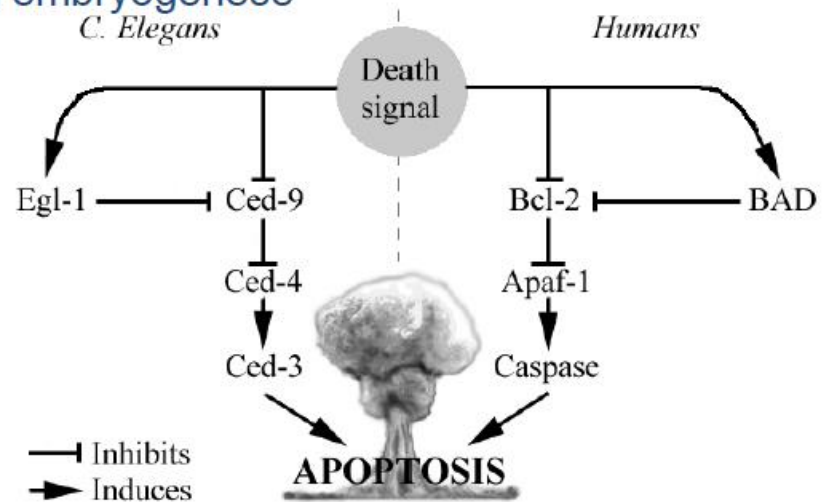
Suivis du lignage cellulaire depuis le zygote jusqu'à l'adulte



# Facilité d'observation

Suivis du lignage cellulaire depuis le zygote jusqu'à l'adulte : 131 cellules sont éliminées par apoptose au cours de l'embryogenèse

Conservation des pathways de l'apoptose entre *C. elegans* et les vertébrés



# Facilité à obtenir des mutants

## Mutagenèse

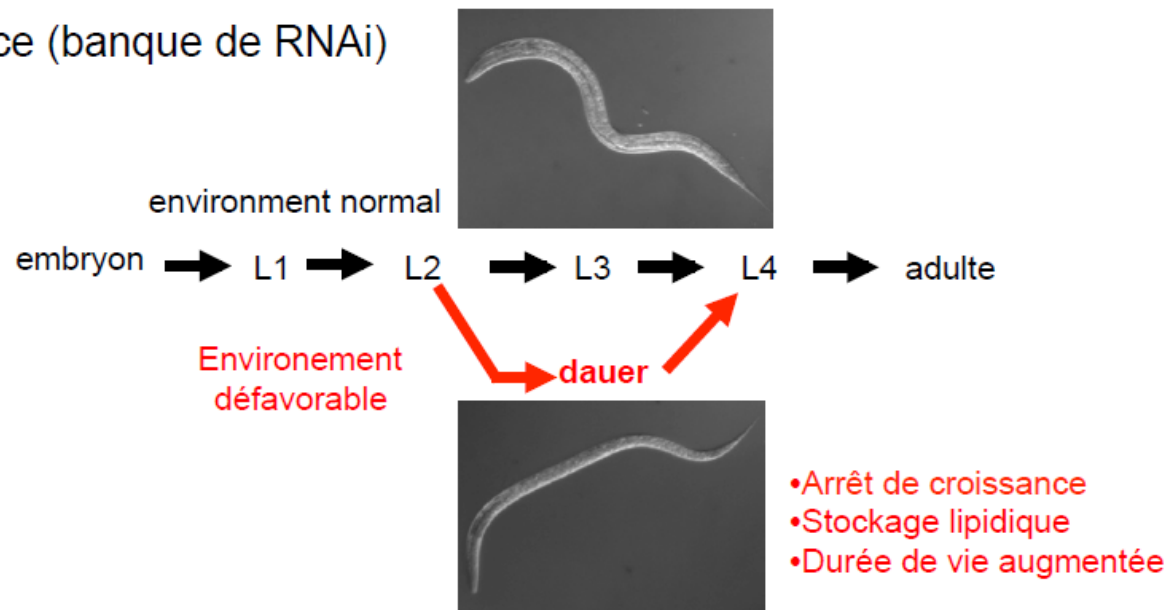
naturelle (élément transposables)

induite par des agents chimiques (ethylmethanesulfonate (EMS), diethyl sulfate (DES), *N*-nitroso-*N*-ethylurea (ENU), or formaldéhyde) ou par irradiation (Xray, UV, particules ionisantes)

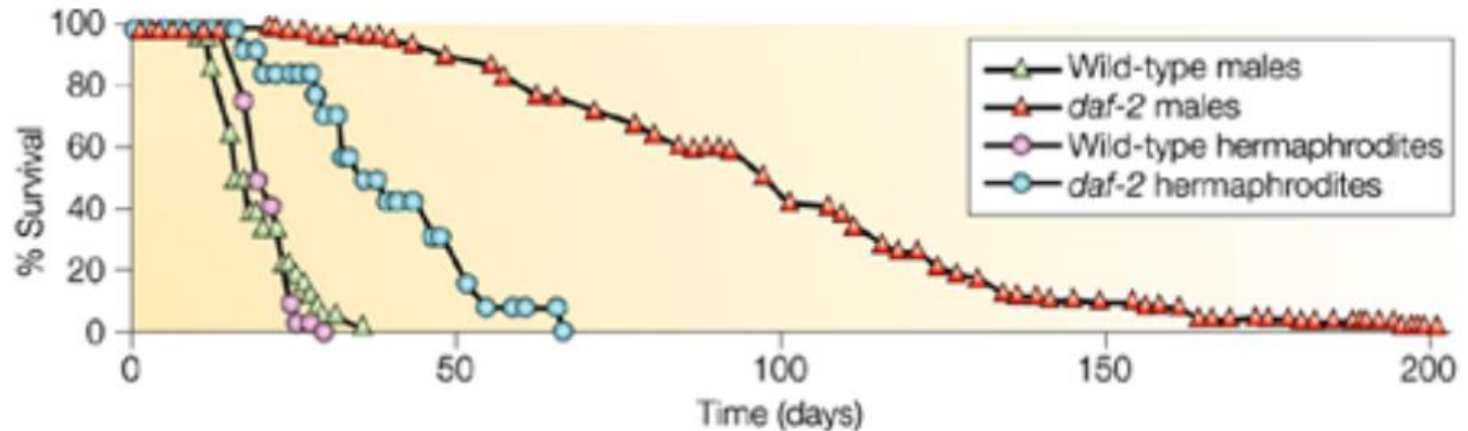
## Micro-injection d'ADN

Collection de mutants disponibles (fluorochromes)

## ARN interférence (banque de RNAi)



# Mutants *daf-2*

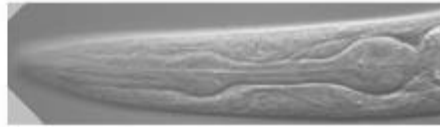


Les mutants *daf-2* ont une durée de vie significativement plus élevée que les wt

A 25°C 100% des *daf-2* sont des larves dauer

# *C. elegans* larval phenotypes

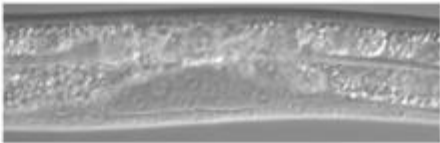
L3 larva



feeding



metabolize fat



develops into a  
fertile adult

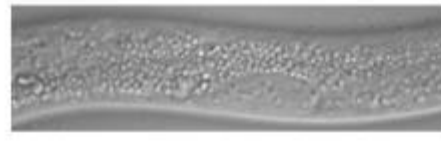
Dauer larva



non-feeding

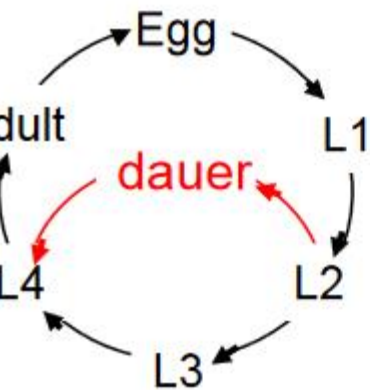
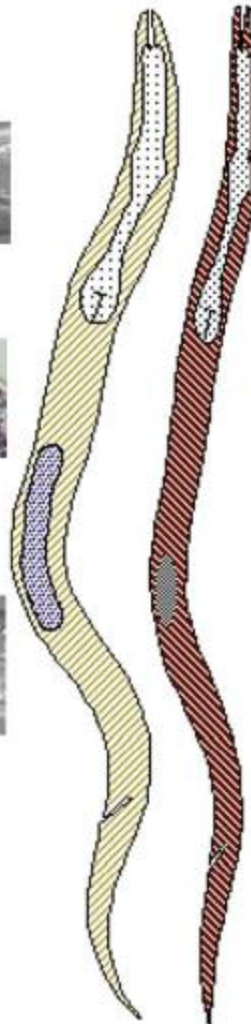


altered fat metabolism



arrested development

Other:  
remodeled tissues  
stress resistant  
long-lived



Dauer larvae live at least 7 times longer than normal



Young adult

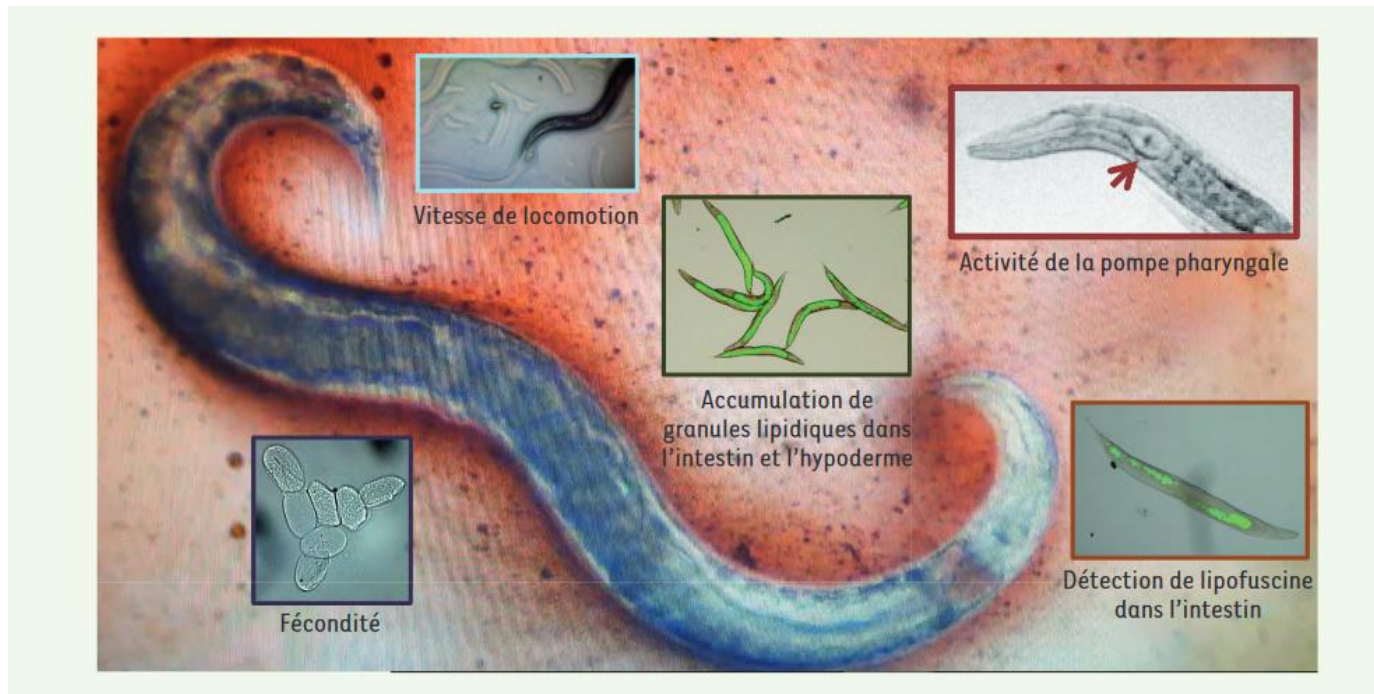


Old adult

### Signs of ageing C elegans

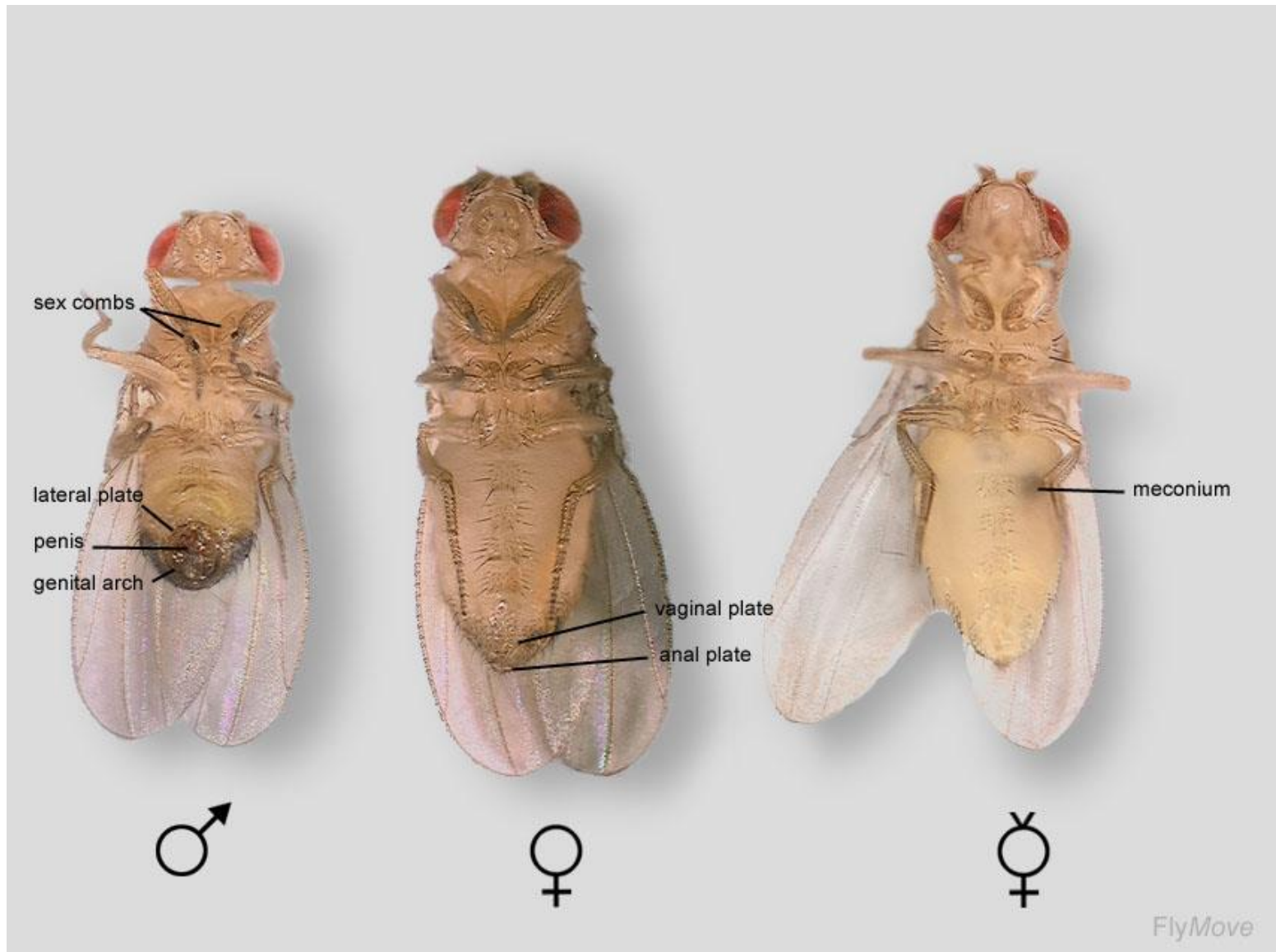
- Reduced fertility, feeding, movement
- Increased cuticular wrinkling (collagen cross linking)
- Increased protein carbonyl, mitochondrial DNA deletions, lipofuscin

# Marqueurs du vieillissement de *C. elegans*





# Modèle drosophile



# Avantages du modèle

Cycle court (10-12 jours)

Présence de chromosomes polythènes

Mutagenèse aisée

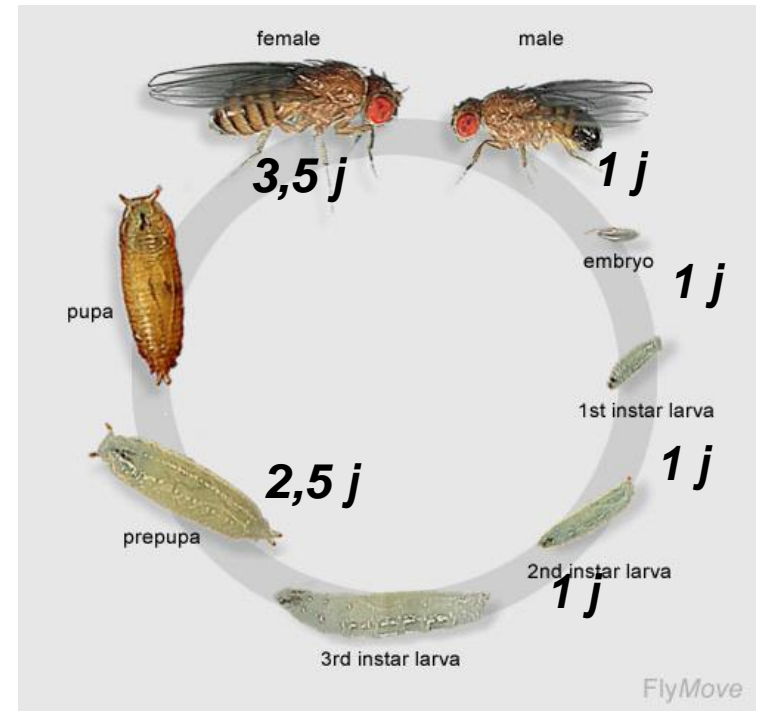
- Rayons X
- Substances chimiques
- Éléments transposables P

Séquençage complet

Données d'expression génique au court du développement (puces Affymetrix et autres)

Embryogenèse précise (17 stades de développement)

Elevage en laboratoire aisé



10 j à 25° C



# Mutations chez la drosophile

Utilisées comme marqueurs

Le plus souvent récessives

Développement de chromosomes  
"balanceurs"

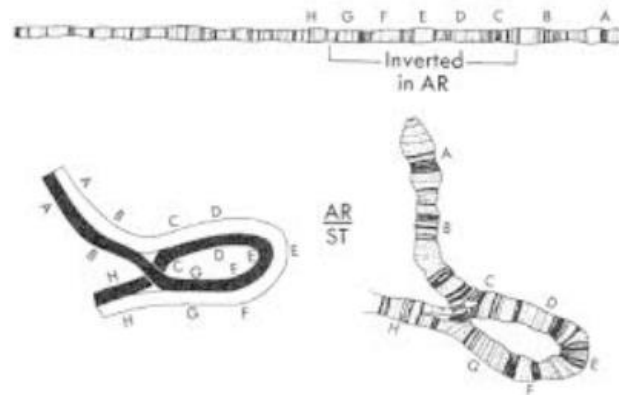
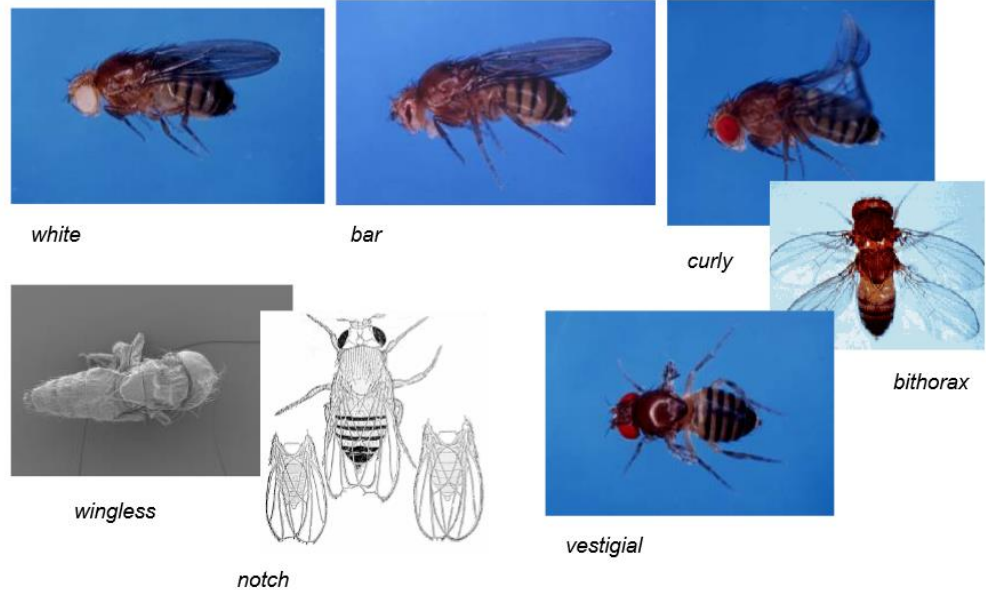
Remaniés pour éviter les recombinaisons avec les chromosomes "normaux"

Banques de mutants

Bloomington (8000 mutants)

Hongrie (insertion élément P)

Ohio Arizona (espèces de drosophiles)



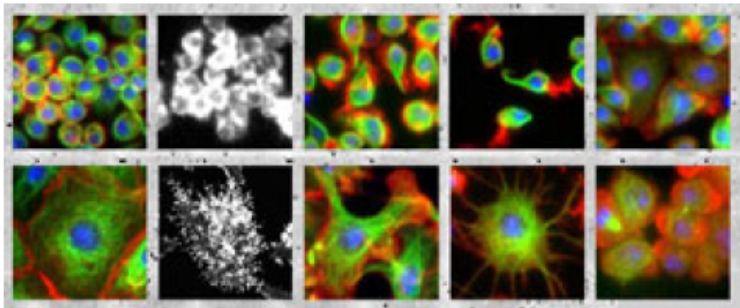
# Inhibition de l'expression génique

Disruption du gène

Inhibiteur pharmacologique

Microinjection d'anticorps

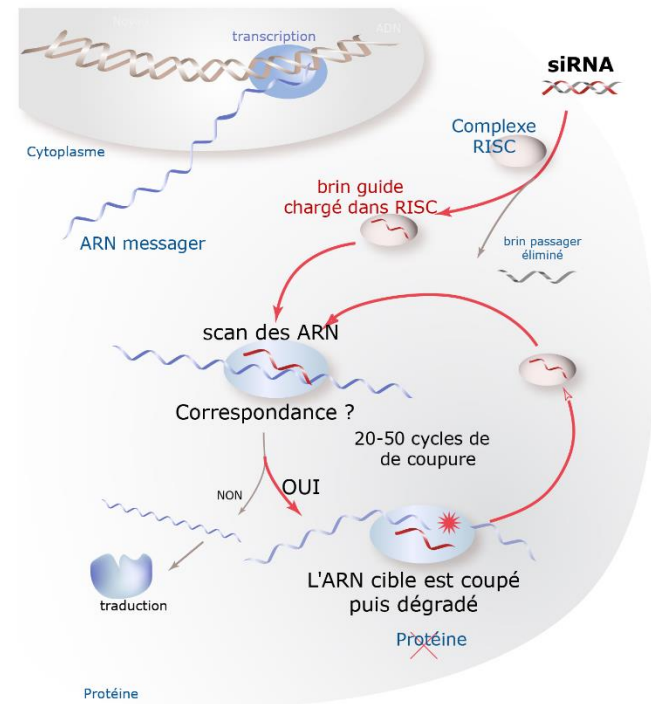
Approche ARN interférence (RNAi)



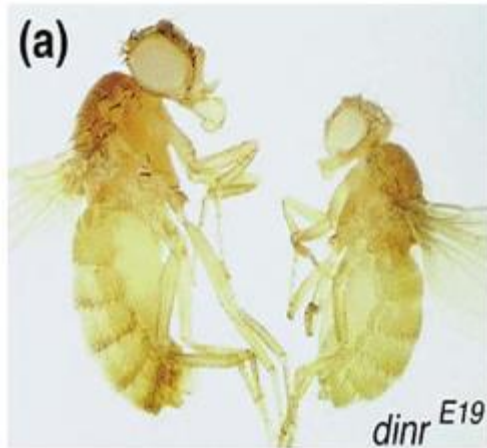
**Systematic RNAi screens in *Drosophila* cells identify known and novel gene functions required for specific cell-biological processes.**

*Foreground:* Systematic RNAi screens in cultured *Drosophila* cells identified gene functions associated with distinct morphological phenotypes. Automated fluorescence microscopy was used to detect organization of filamentous-actin (red), microtubules (alpha-tubulin, green) and DNA (blue), allowing unprecedented genetic dissection of cellular morphogenesis. Specific defects included those in cell adhesion, lamellipodia formation, cell cycle progression and cytokinesis.

**Kiger, A. A., B. Baum, S. Jones, M. Jones, A. Coulson, C. Echeverri, N. Perrimon.** 2003. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA-interference. *J. Biol.*, 2: 27.



# Maladies endocrines



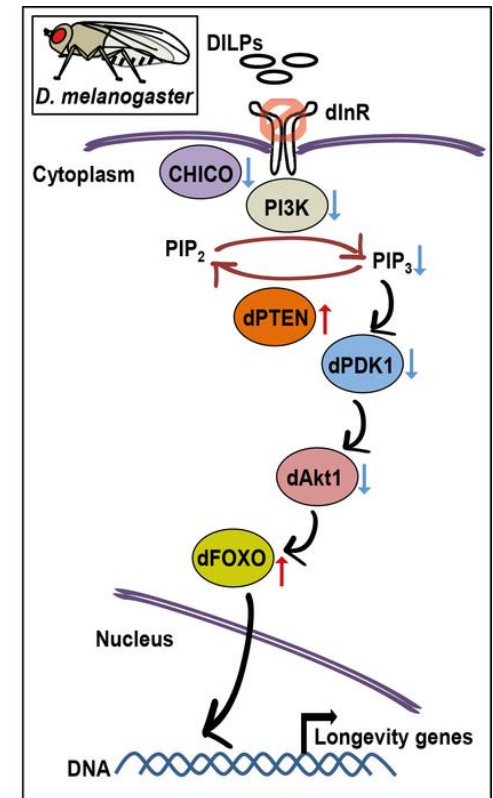
A fly containing a loss of function mutation in Dlnr has a reduced body size (right). A fly with a wild-type Dlnr is present on the left



Insuline joue un rôle régulateur (homéostasie) et croissance chez la mouche; présence de récepteurs (Dlnr) et de peptides insuline-like (DILP)

Mutation Dlnr : mean female lifespan increased by up to 85%

Mutation of Chico: lifespan increased by up to 48%



# Maladies neurologiques

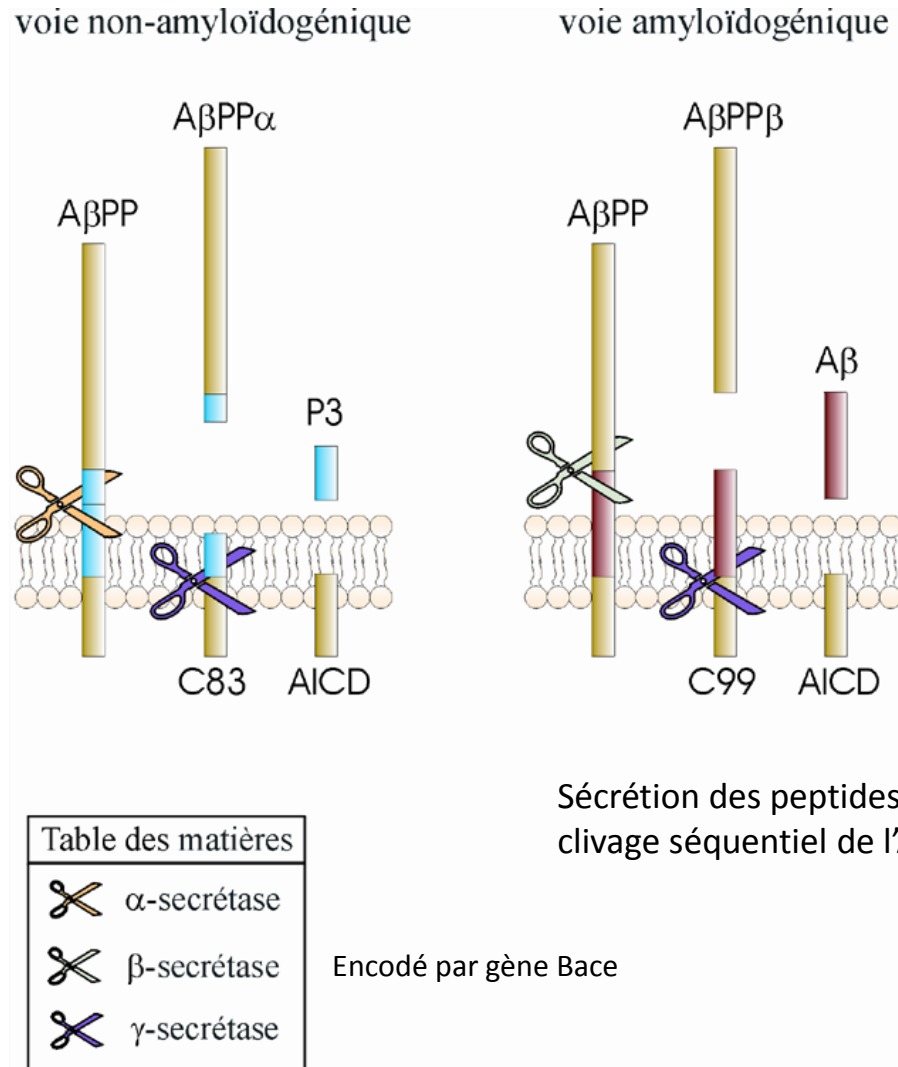
---

- **Les maladies neurodégénératives (ND) sont un terrain d'élection pour les études sur Drosophile.**

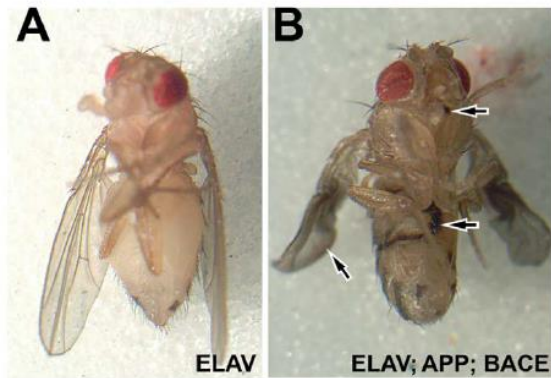
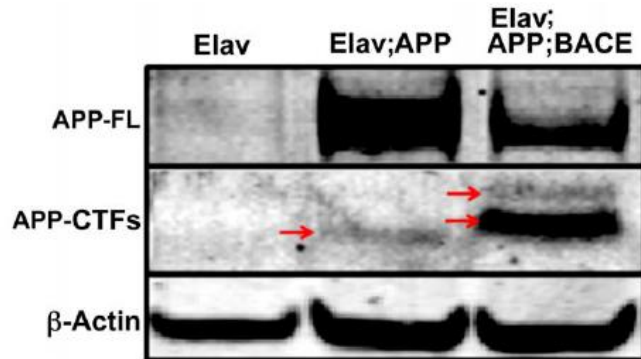
**Sur 59 gènes impliqués dans des maladies connus pour affecter les maladies ND, 38 sont conservés chez la Drosophila**

- **Les modèles les plus étudiés concernent:**
  - **La maladie de Parkinson**
  - **Alzheimer**
  - **La chorée de Huntington**

# Drosophile et maladie d'Alzheimer



# Modèle Alzheimer: expression du gène APP humain seul ou avec BACE ( $\beta$ secrétase) par le système GAL4/UAS: promoteur elav/GAL4



**C**

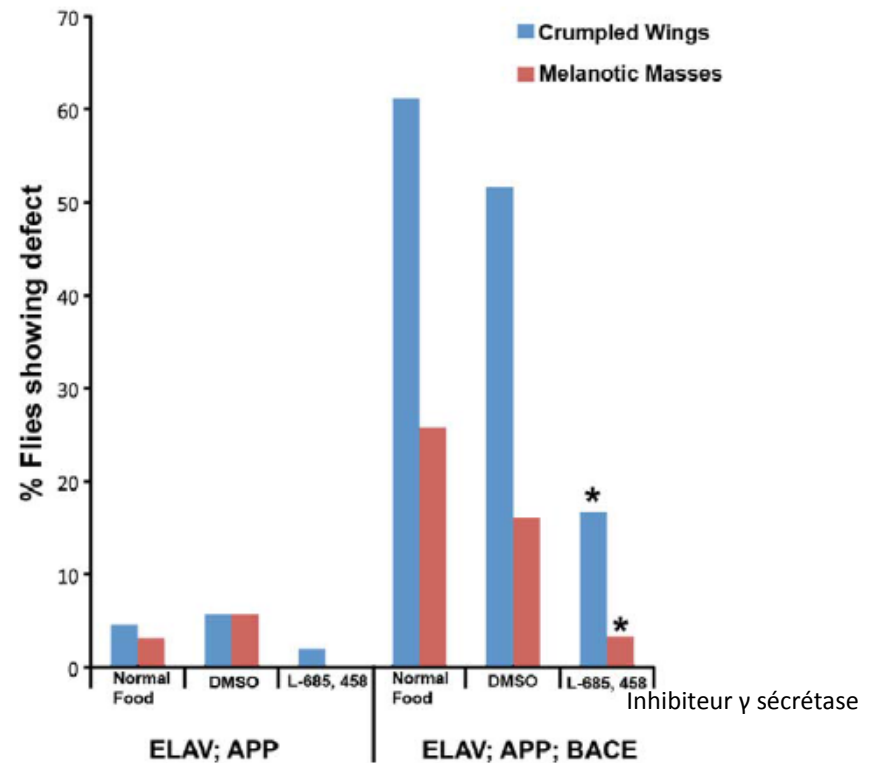
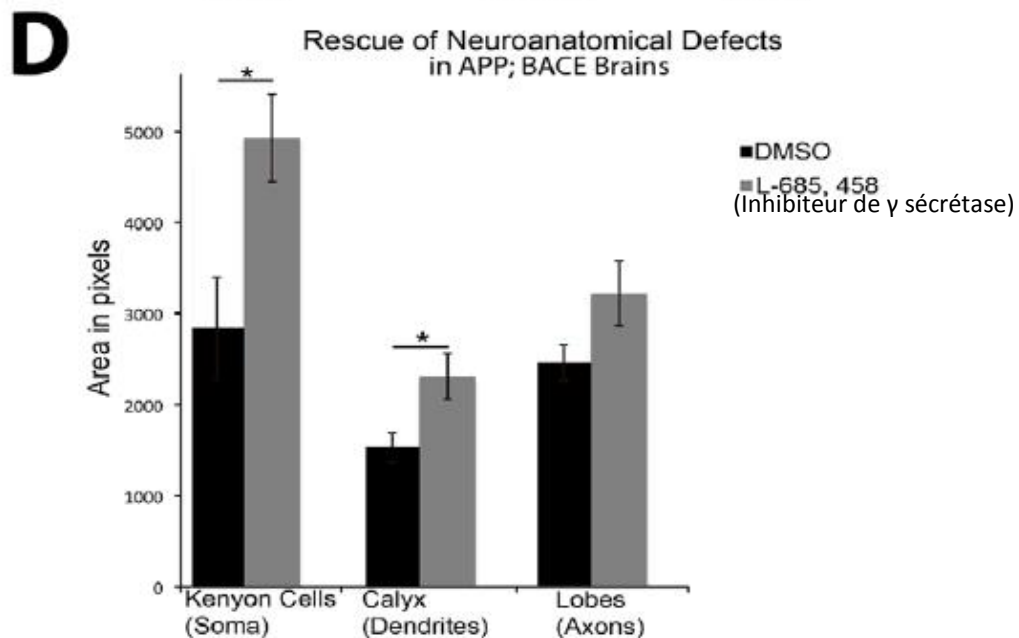
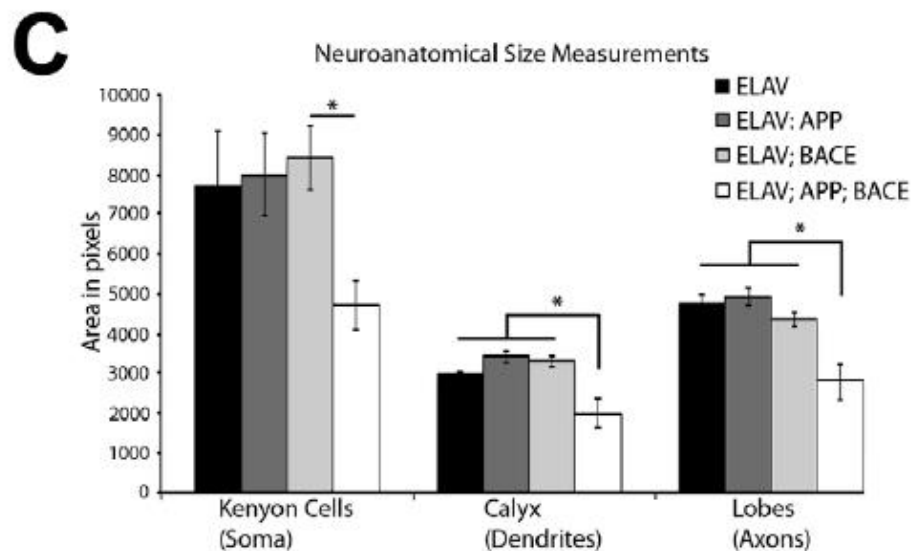
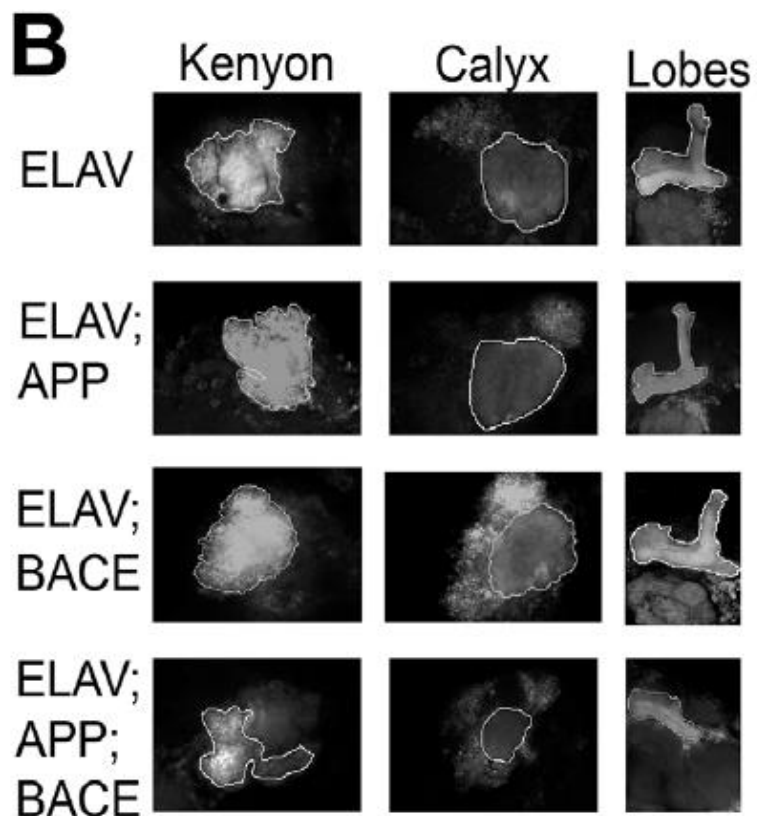


Figure 2. External morphology and longevity in AD flies.





# Comportement: apprentissage



Heisenberg, 2003

- Le plus étudié: l'apprentissage associatif, à court terme et à long terme
  - Choc électrique + odeur
- 
- Bases moléculaires apprentissage conservées chez humain.
  - Ex: gènes impliqués dans la mémorisation – cascade AMPc, gène CREB pour mémoire à moyen terme

# Poisson Zèbre

---



# Avantages du zebrafish

C'est un vertébré

Elevage à faible cout

Peu gourmand en espace (au début)

Manipulation facile (embryon transparent)

Développement rapide

organes formés et circulation sanguine en 24h

Entièrement séquencé

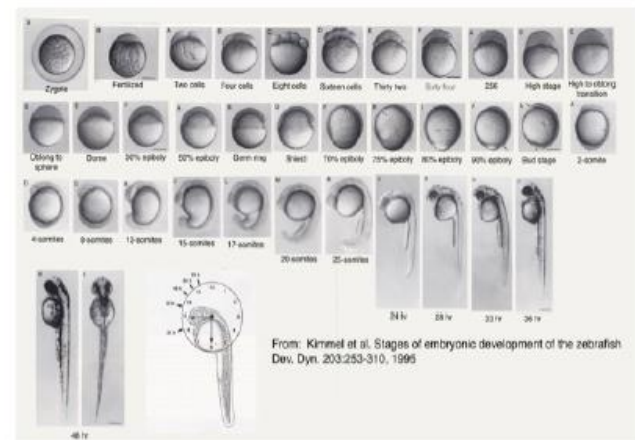
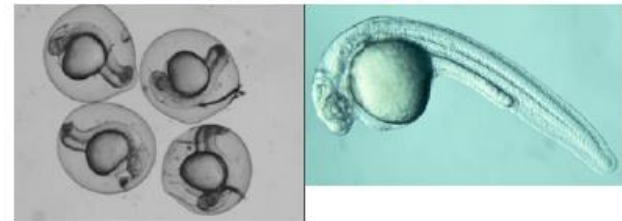
Grande collection de mutants

invalidation ou surexpression de gènes

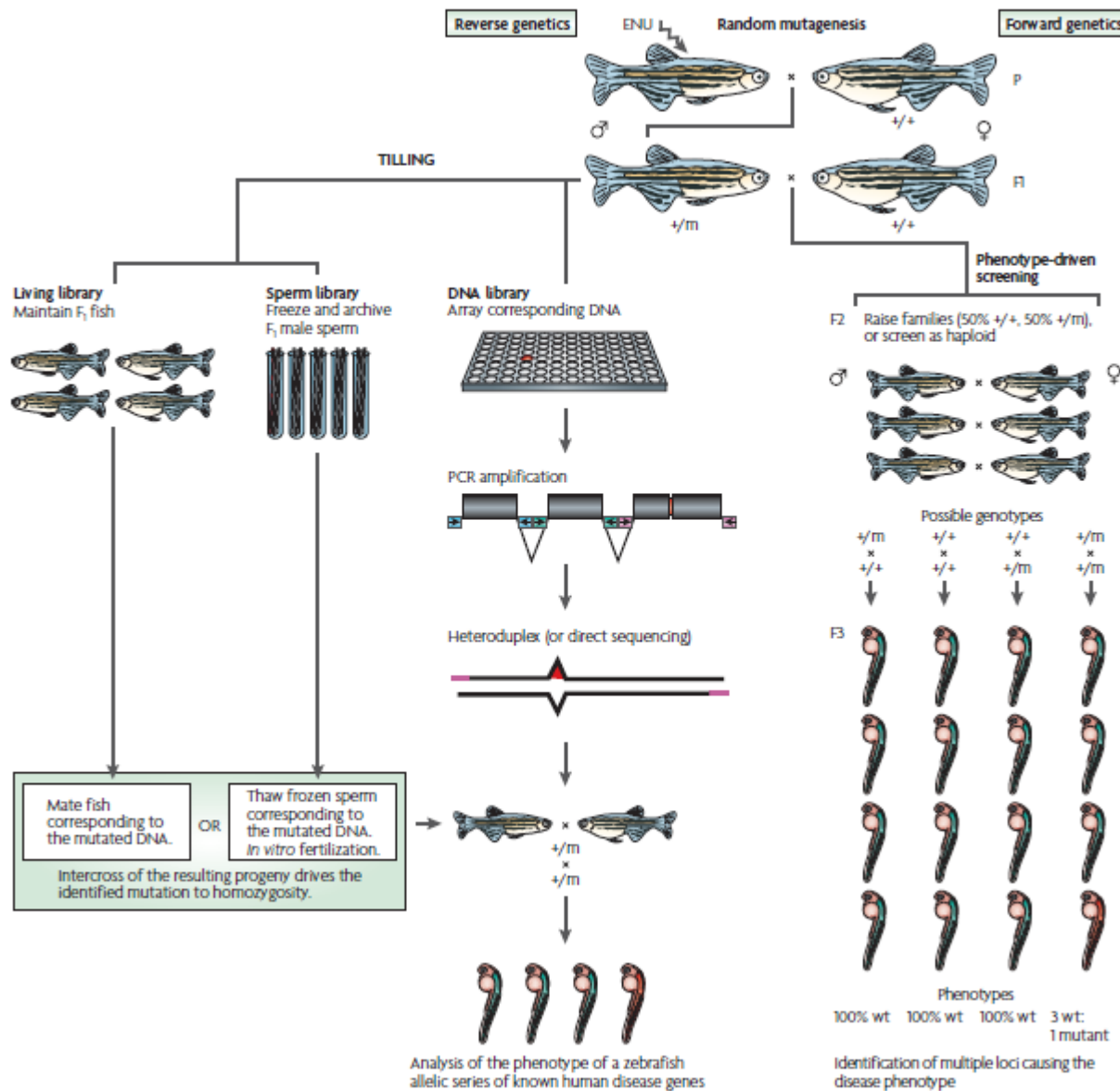
Outils génétiques

morpholinos

Test de molécules facile



# Génération de modèles à grande échelle



300 mâles traités ENU

F1 hétérozygotes

Plus de 5000 familles F<sub>2</sub>

Analyse de plus de 6000 genomes mutés

Sélection de plus de 200 nouveaux mutants de développement

# Utilisation des morpholino-oligonucléotides MO

## ADN anti-sens simple brin modifié

25 nucléotides environ

complémentaire de l'ARNm ciblé

cycles aromatiques désoxyriboses remplacés par des cycles morpholines

le pont phosphodiester anionique est remplacé par un

pontphosphorodiamidate

Molécule très spécifique, peu toxique et stable (résiste aux nucléases)

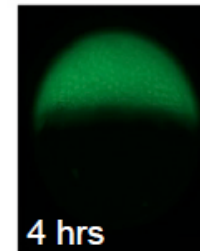
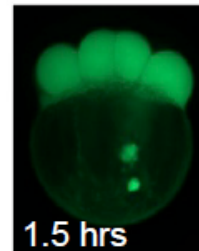
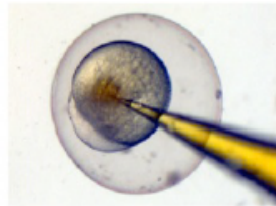
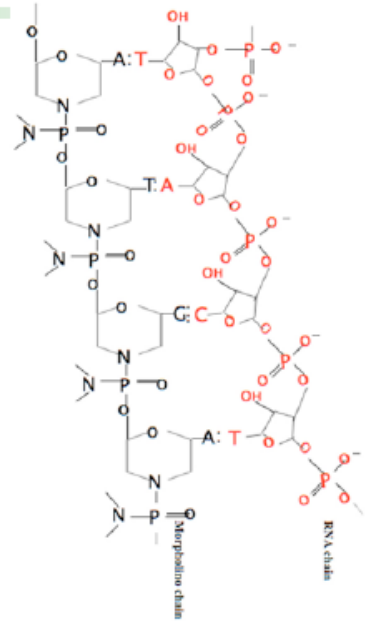
## Peut être micro injectée

Injection au stade 1 à 4 cellules

Analyse des phénotypes dès 24h post injection

ou directement ajoutée dans l'eau

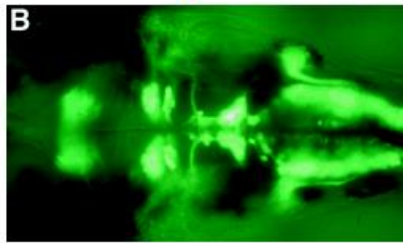
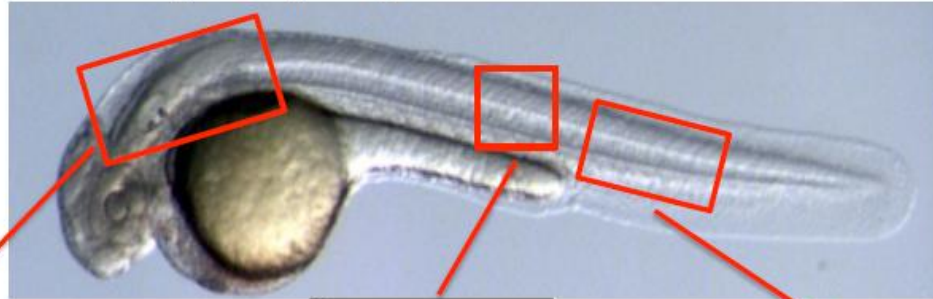
Efficacité 5 à 6 jours



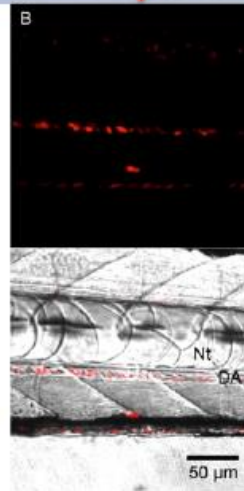
# Autres possibilités d'études du zebrafish

Nombreuses lignées des zebrafish transgéniques

GFP ou DsRed fusionnés à des gènes spécifiques

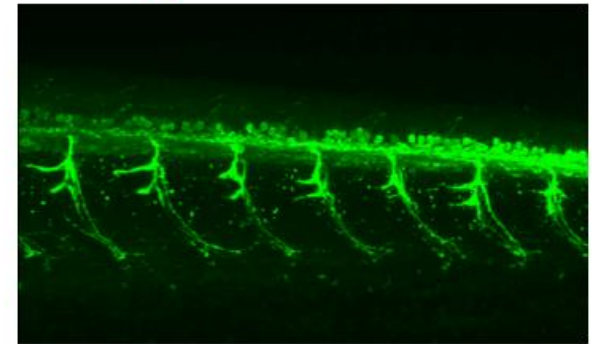


*Islet-1:GFP*



*Gata-1:DsRed*

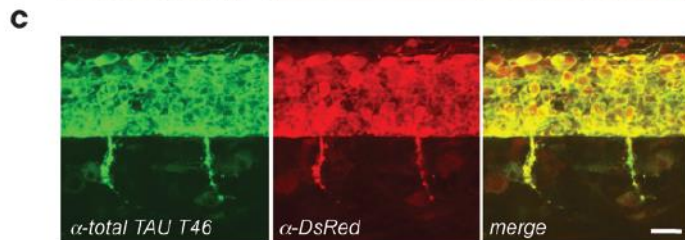
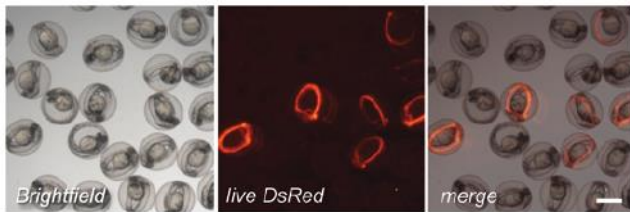
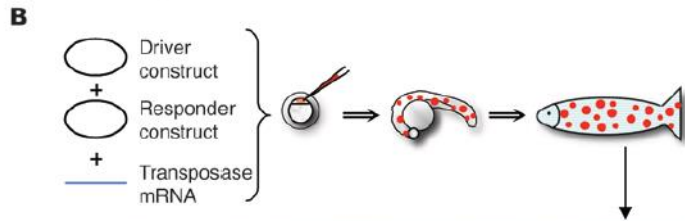
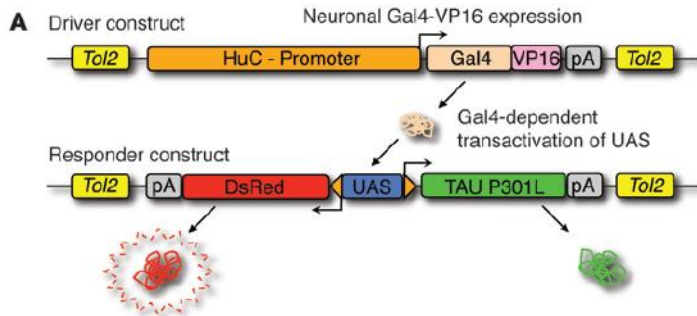
*Olig2:GFP*



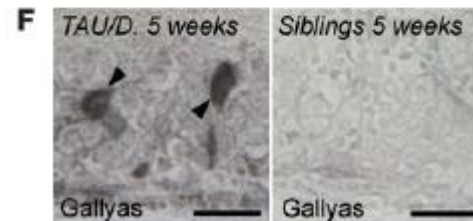
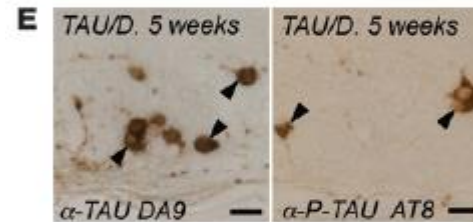
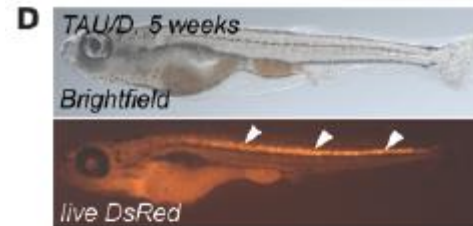
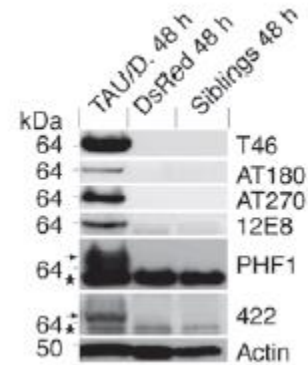
Transgénèse par transposon (Tol2)

CRISPR/CAS9

# Modèle de Tauopathie

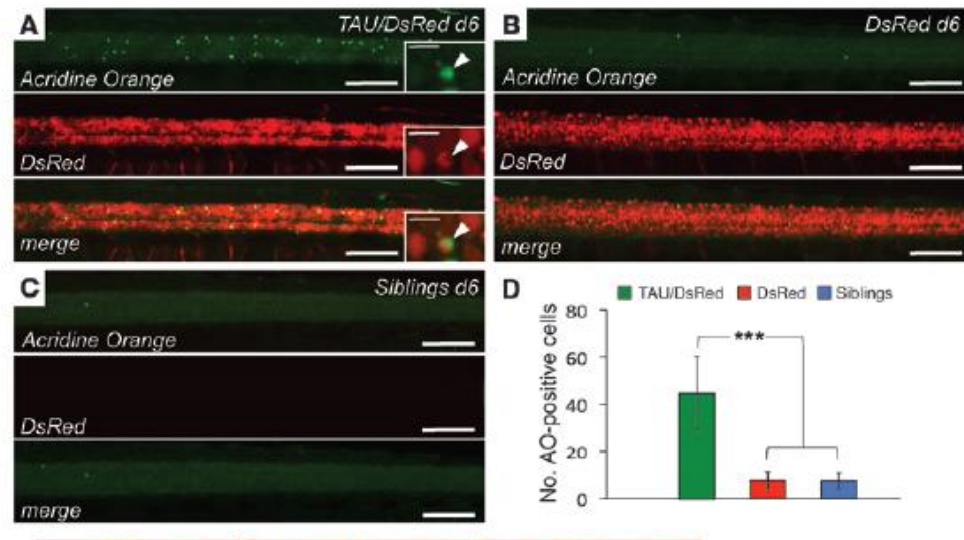
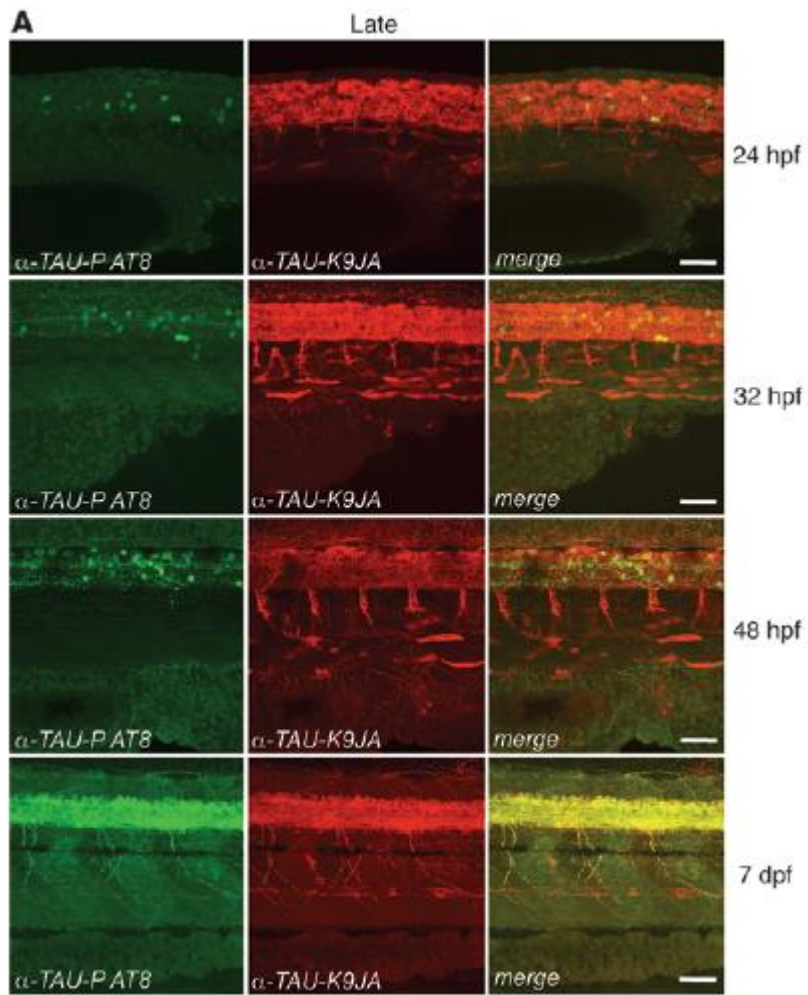


**B**



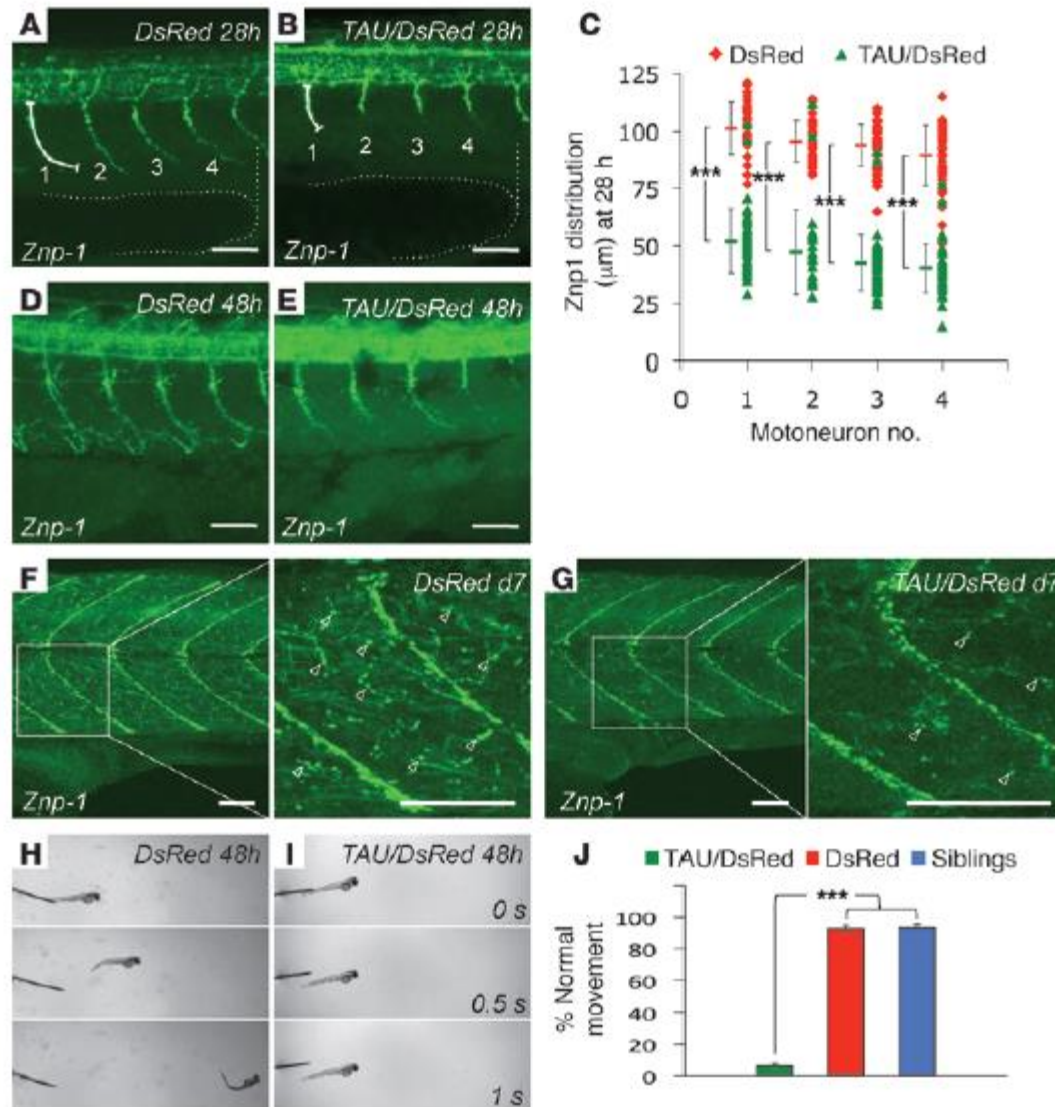
Accumulation de Tau





Mort neuronale

Progression rapide de l'accumulation de Tau



Expression de hTau entraîne des anomalies dans la morphologie neuronale et dans le comportement

# Modèle : la souris

---



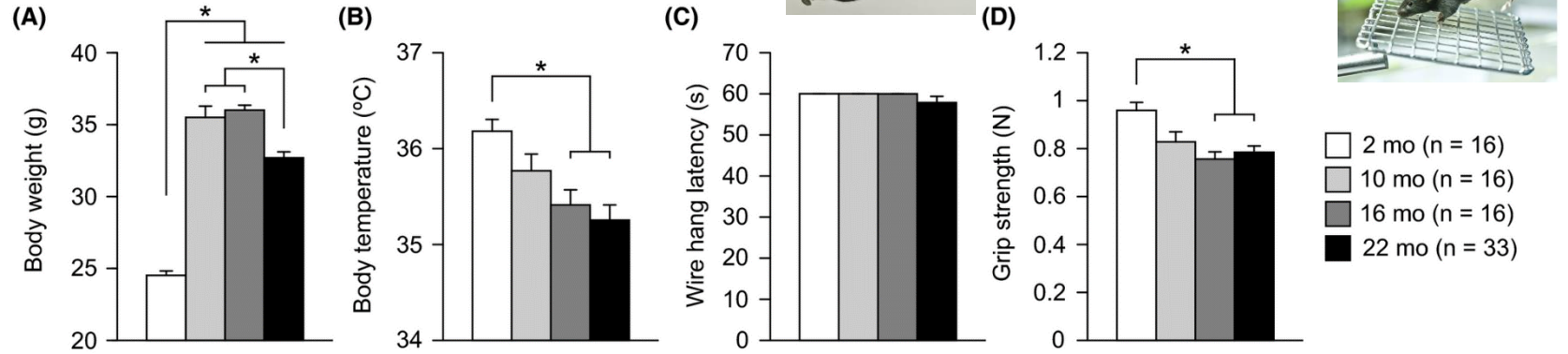
- Facilité d'élevage
- Lignées pures
- Croisements faciles
- Temps de génération court (~21 jours)
- Physiologie pas trop éloignée de celle de l'homme
- Connaissance complète du génome
- Manipulation du génome de la souris

Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program

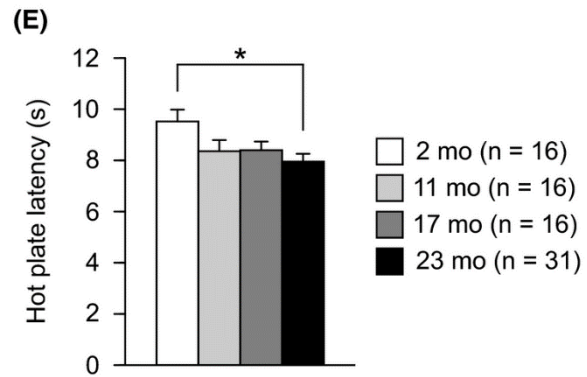


Shoji and Miyakawa 2019

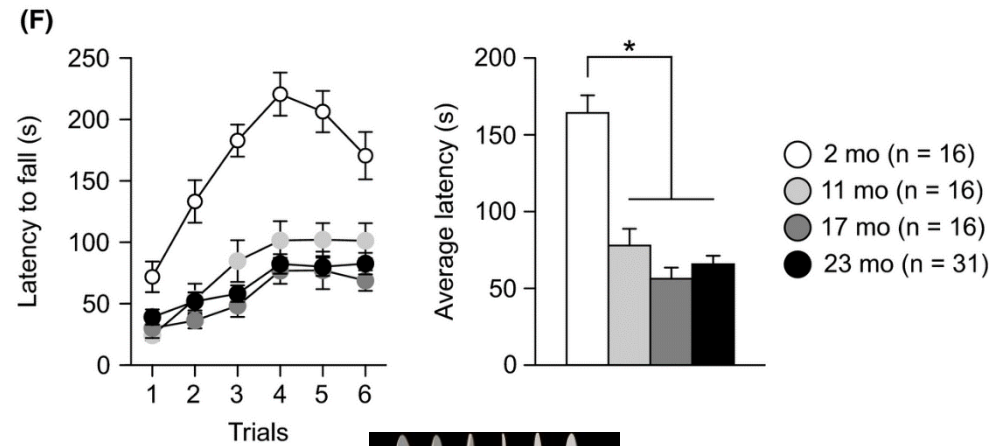
General health and neurological screen



Hot plate test

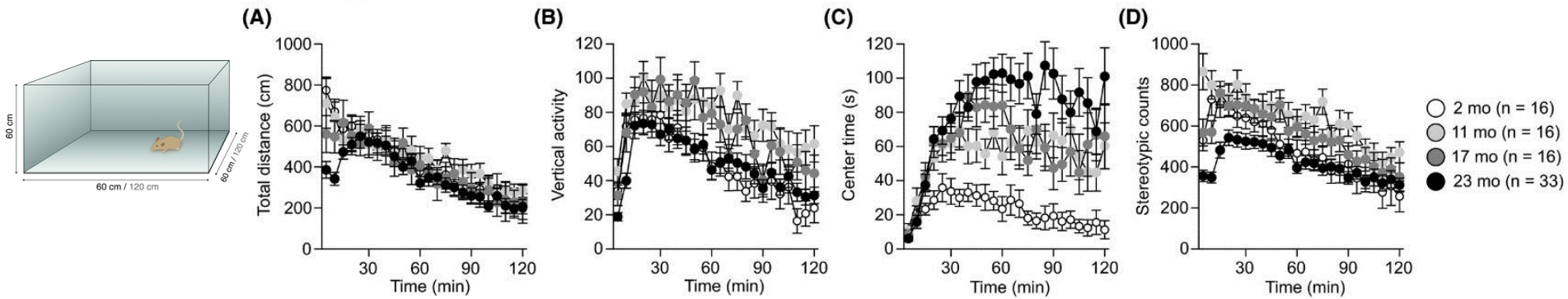


Rotarod test

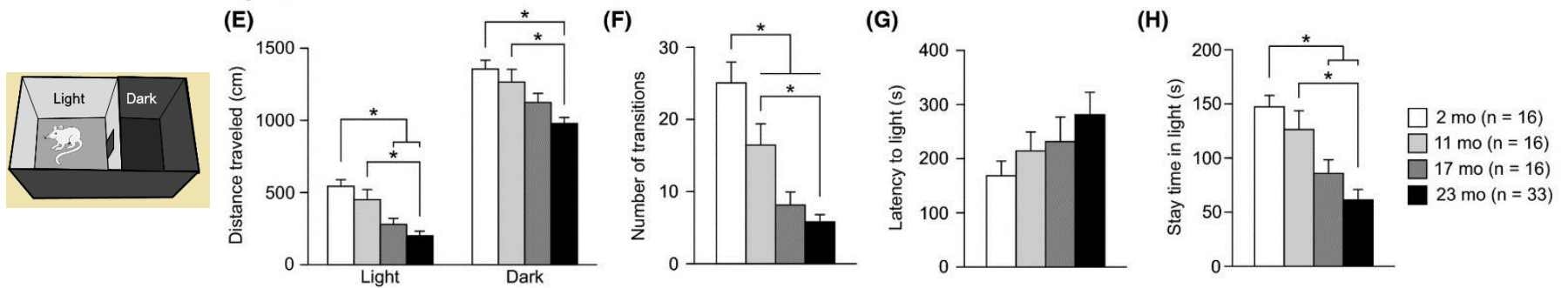


Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program

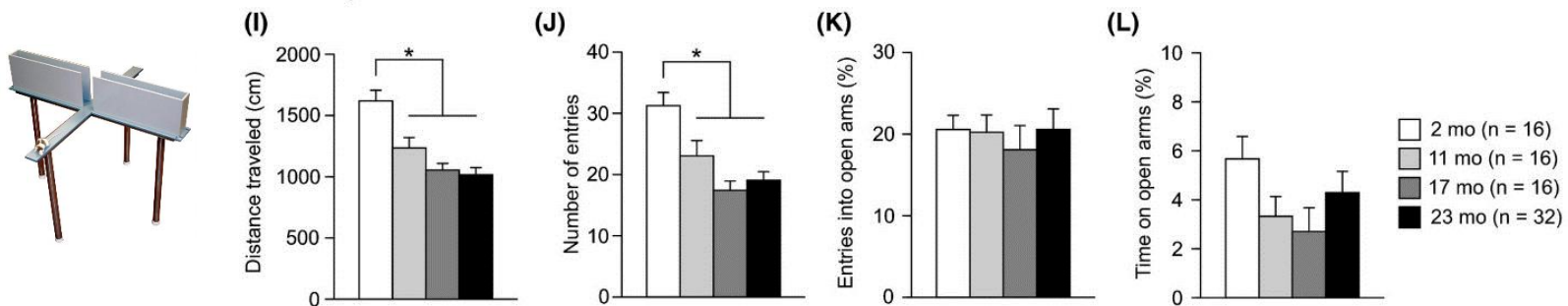
Open field test

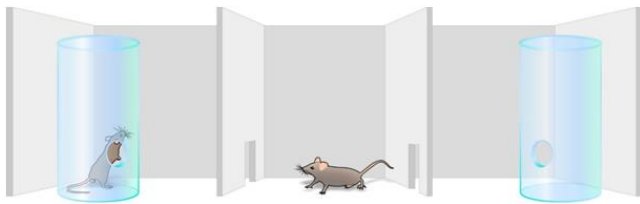


Light/dark transition test

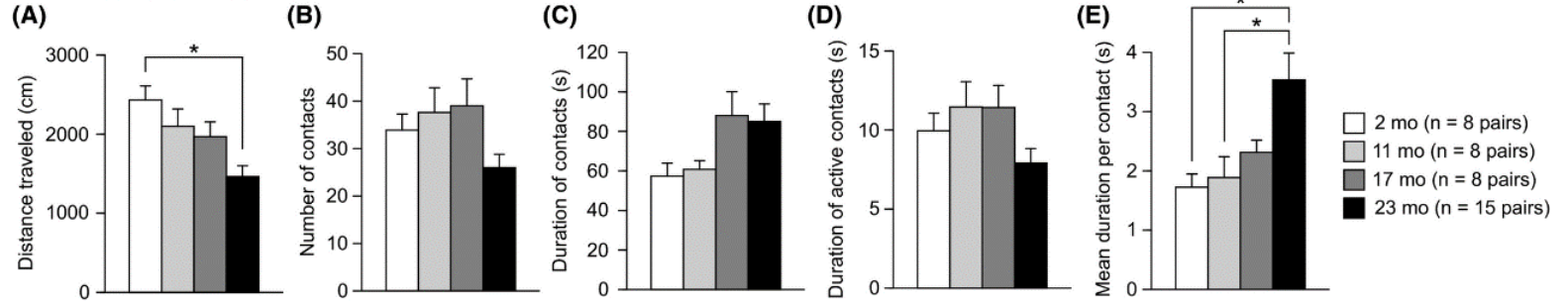


Elevated plus maze test



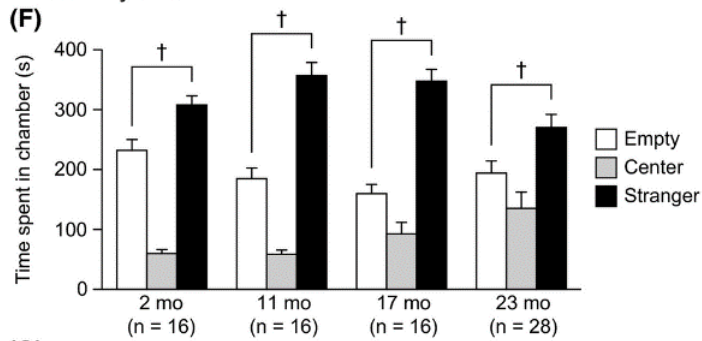


### Social interaction test

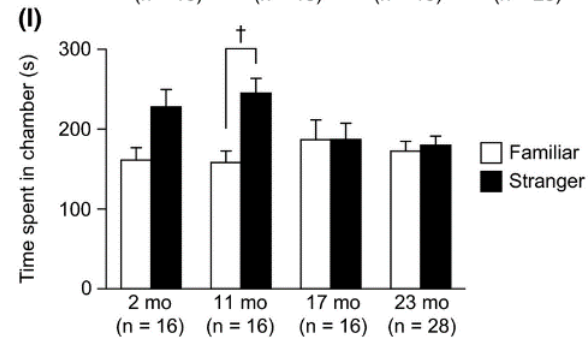
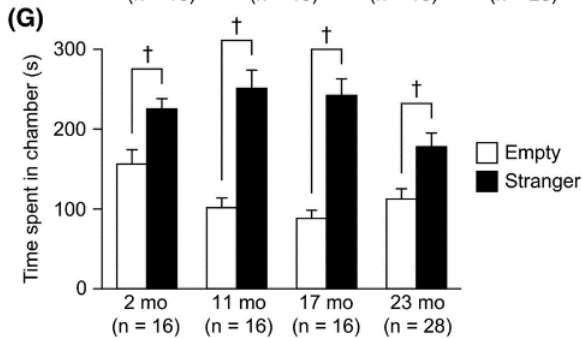
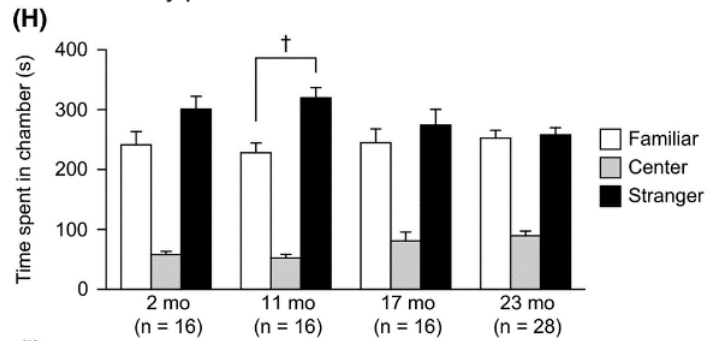


### Three-chamber social approach test

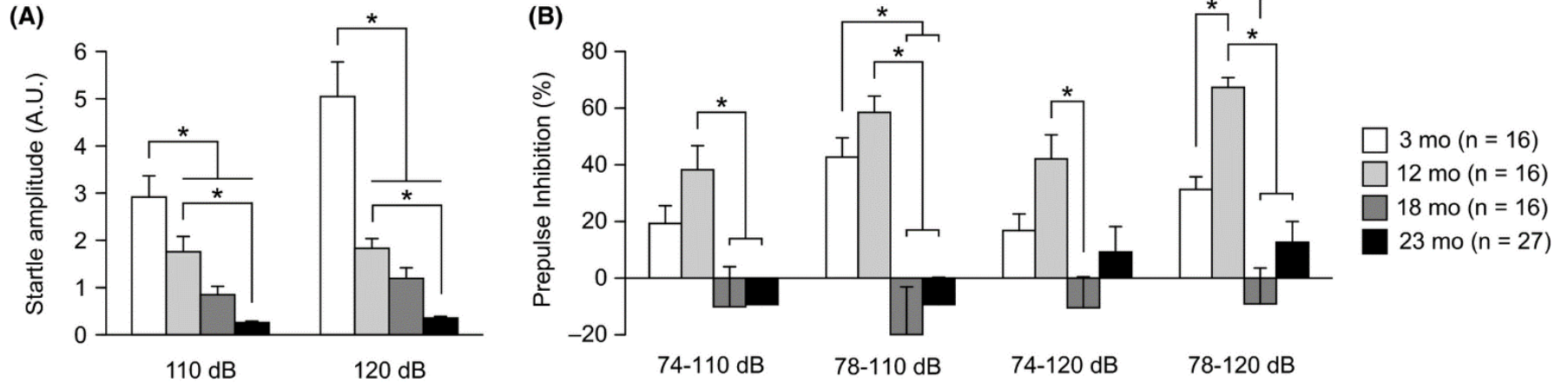
#### Sociability test



#### Social novelty preference test



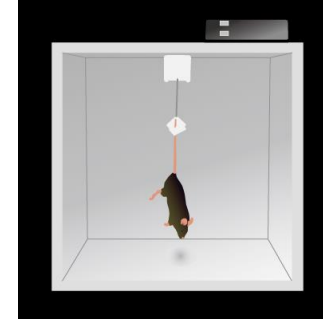
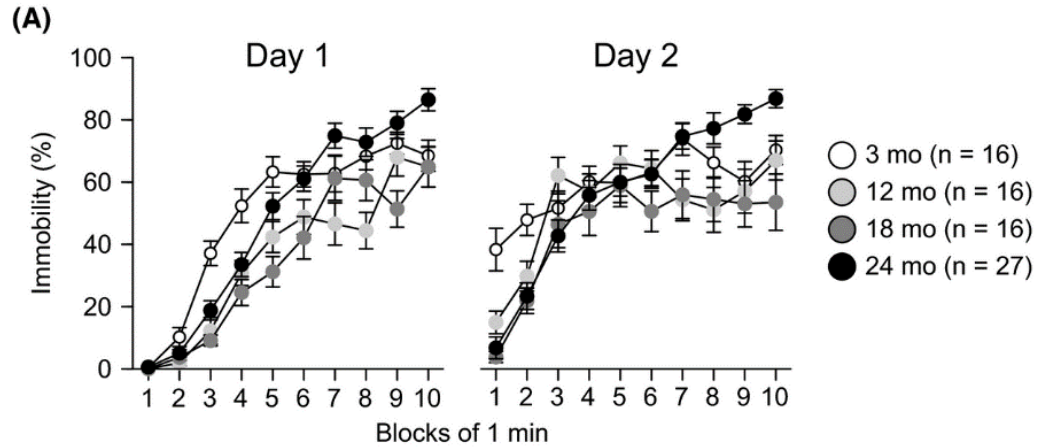
Startle response/prepulse inhibition test



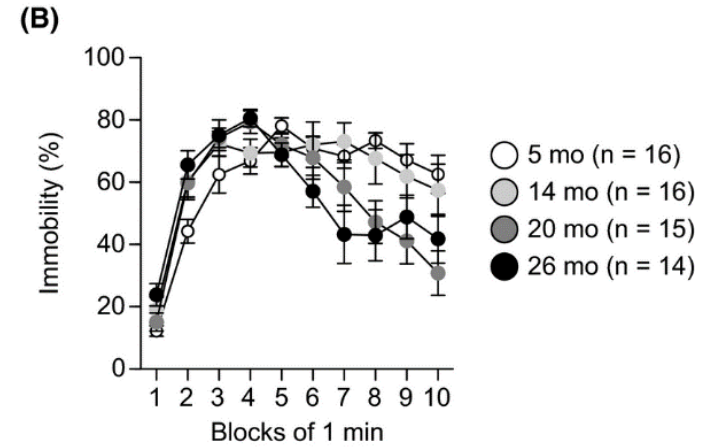


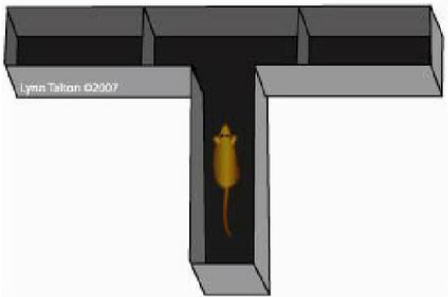


Porsolt forced swim test

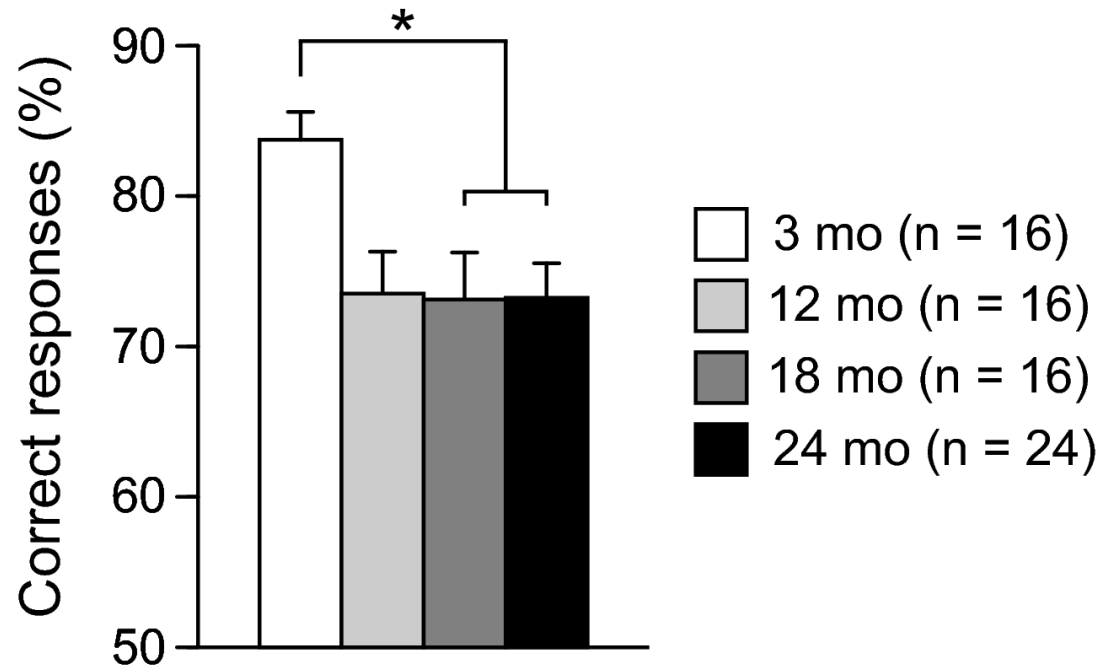


Tail suspension test



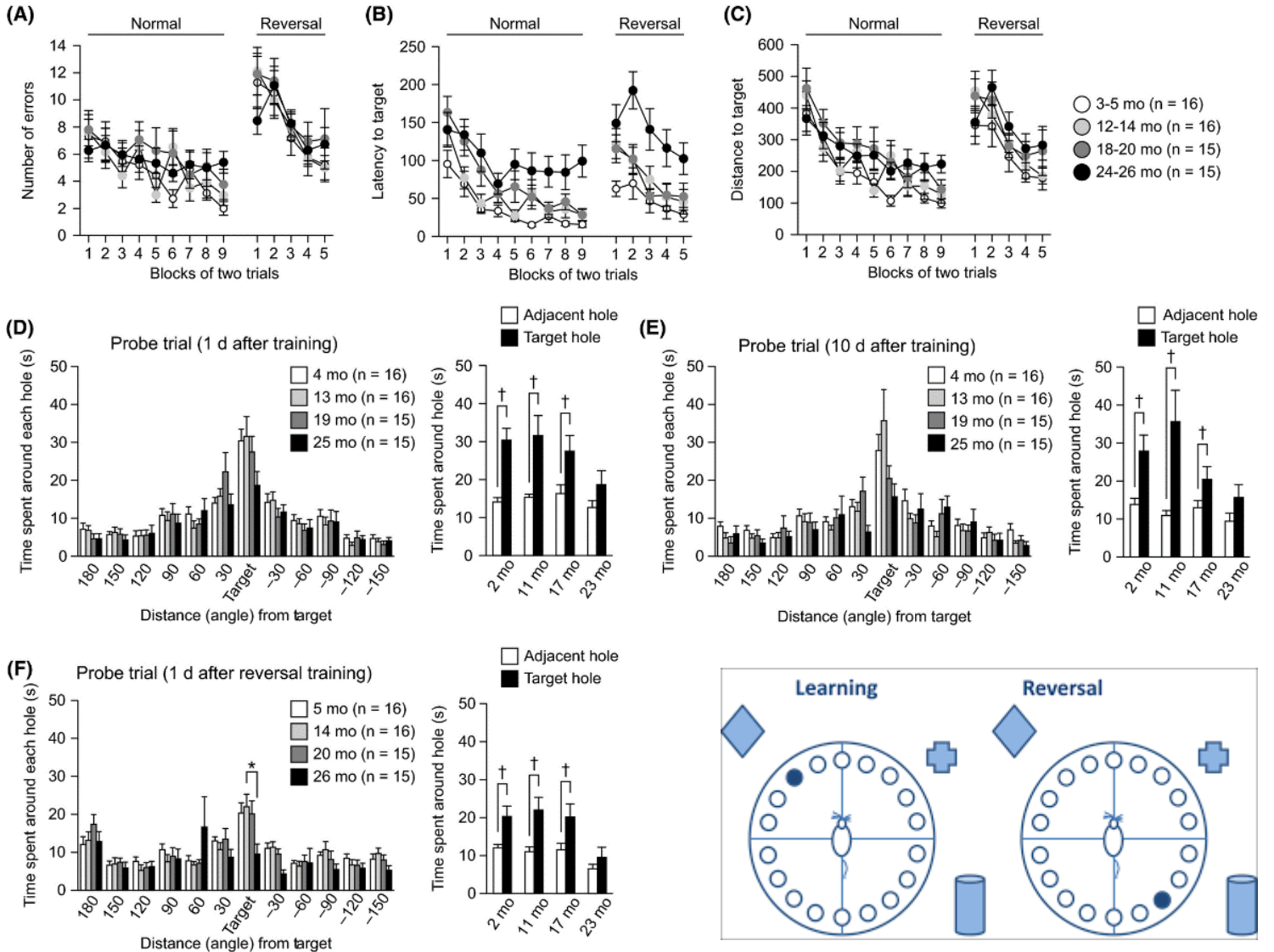


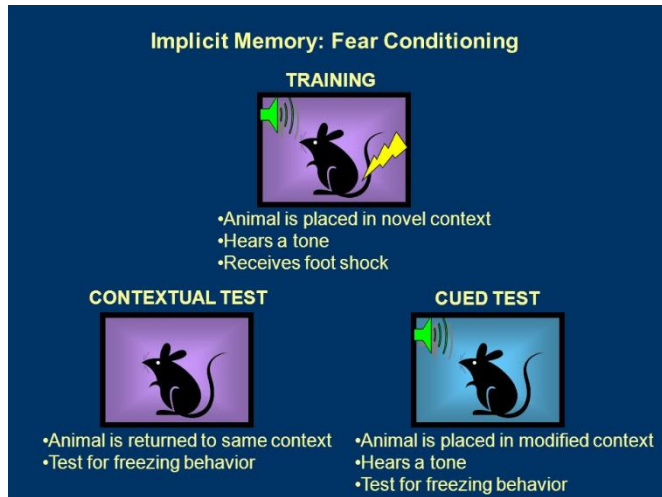
## T-maze spontaneous alternation test



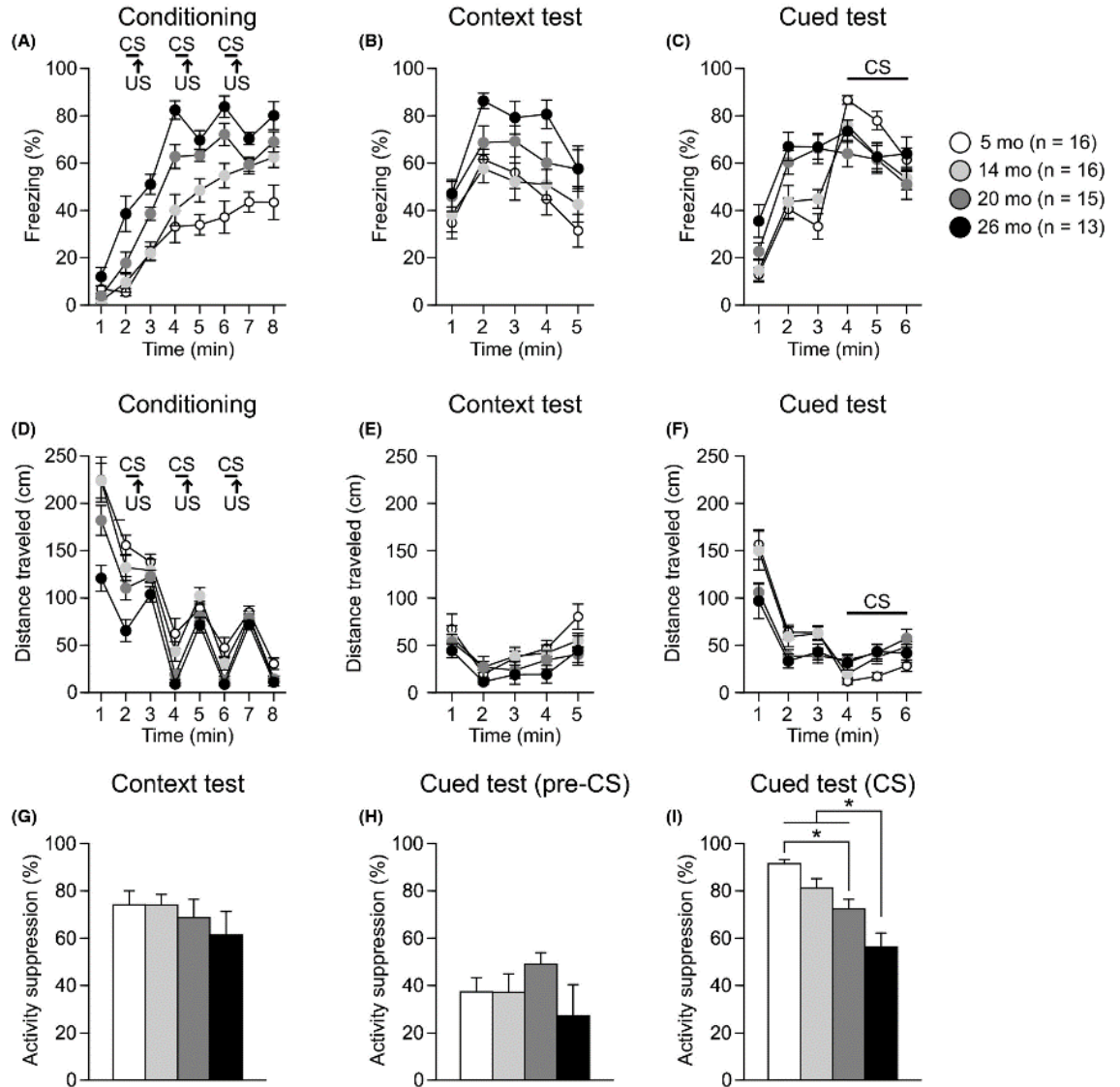
Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program

Barnes maze test





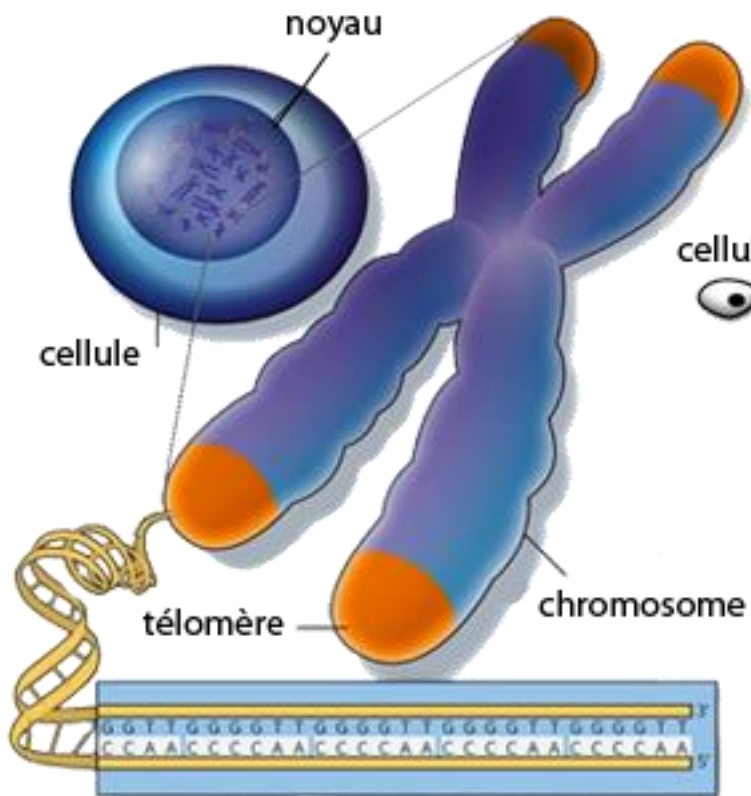
Contextual and cued fear conditioning test



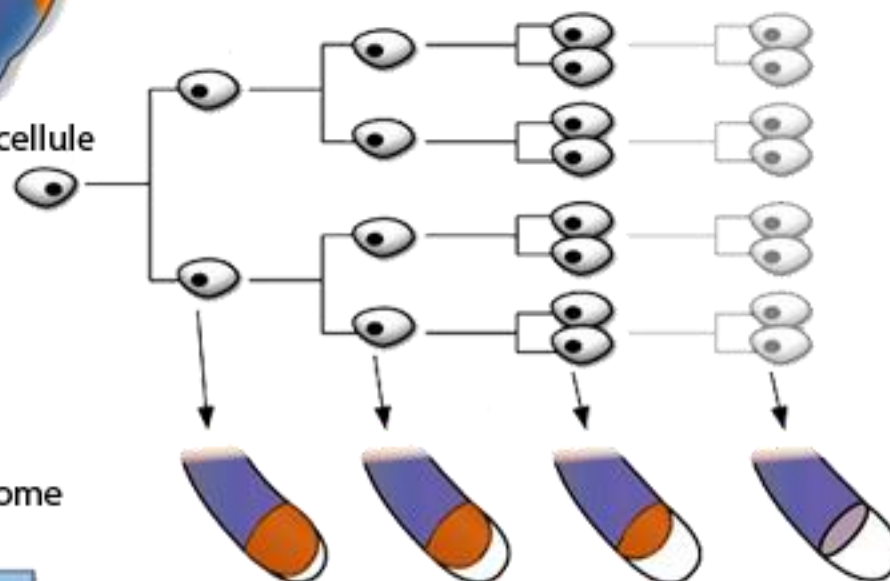
# Telomerase gene therapy

Whittemore et al, Aging 2019

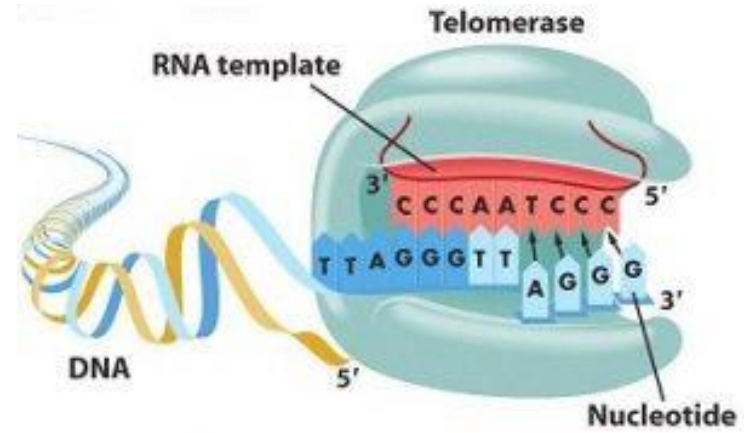
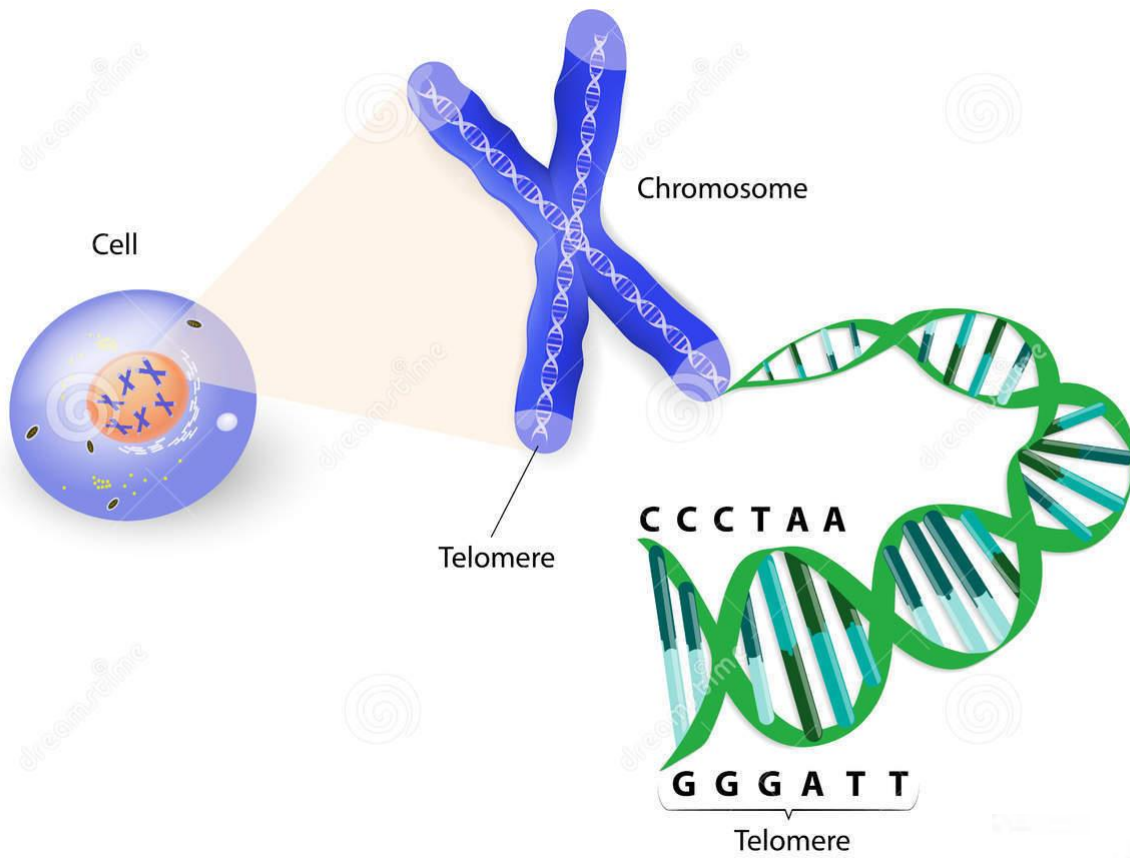




*Tout au long de la division cellulaire (cellule saine)...*

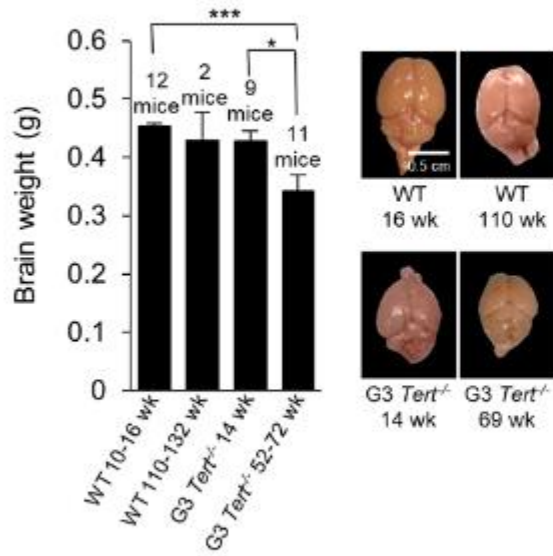


*...les télomères raccourcissent, jusqu'au moment où la division cellulaire s'arrête (sénescence).*

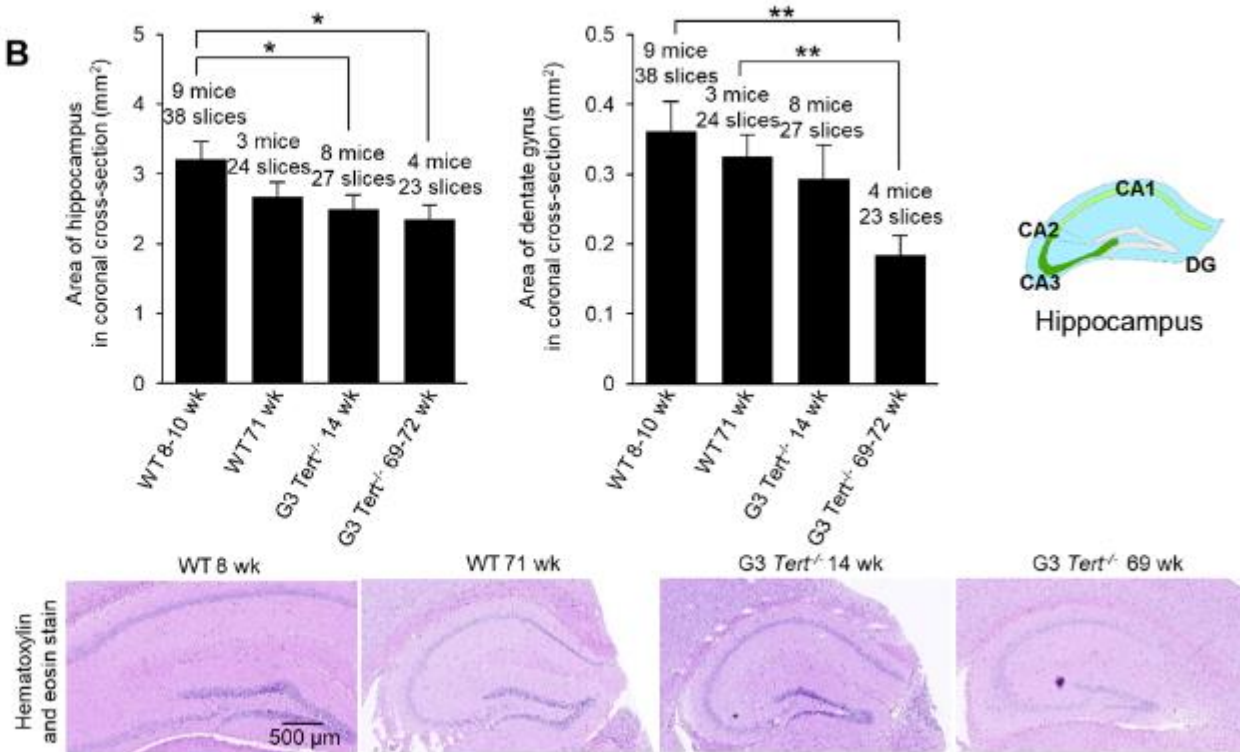


# Caractérisation des souris KO pour Télomérase

**A**



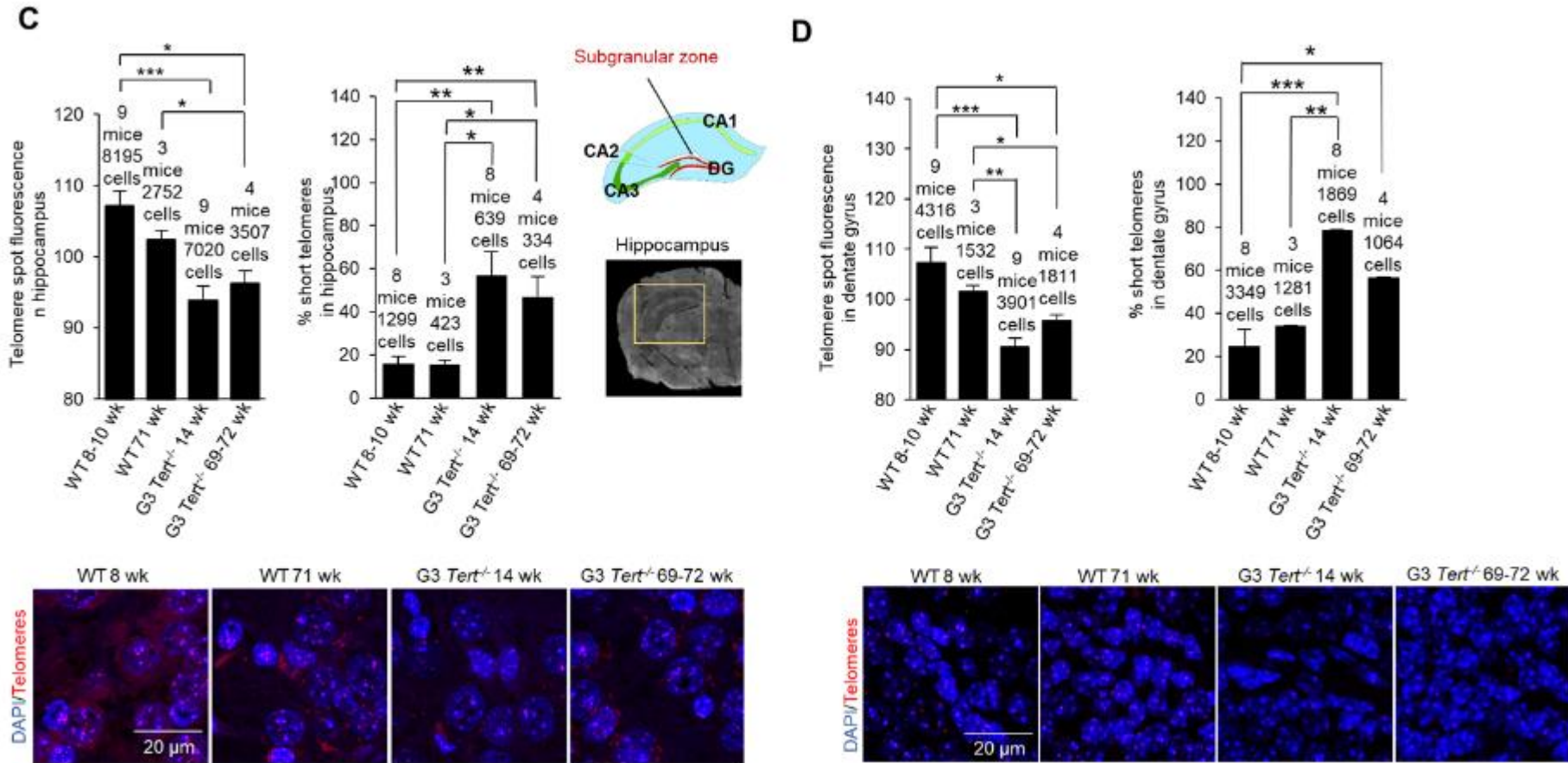
**B**



Mice deficient for telomerase have smaller brains

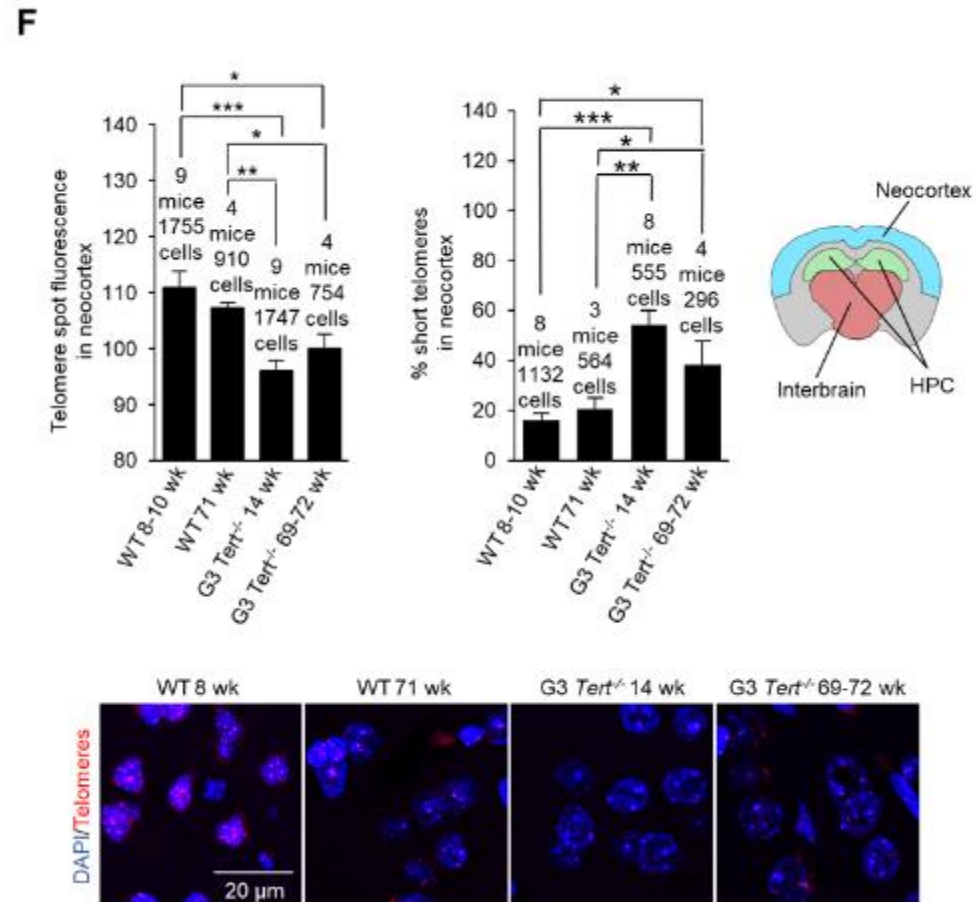
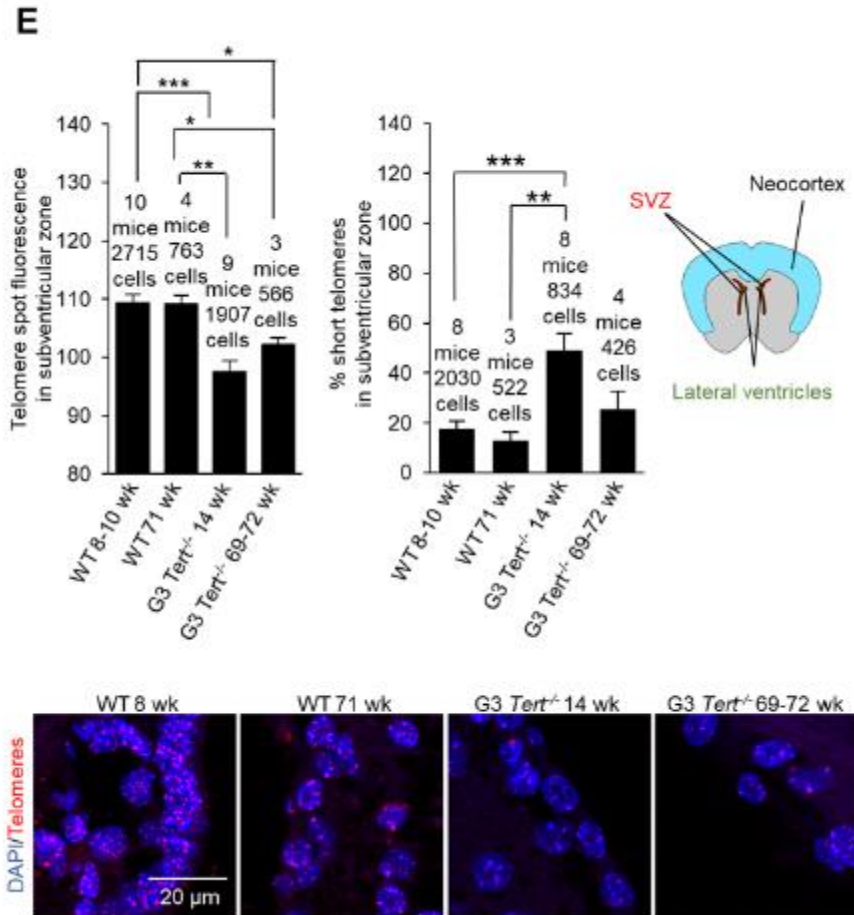


# Caractérisation des souris KO pour Télomérase



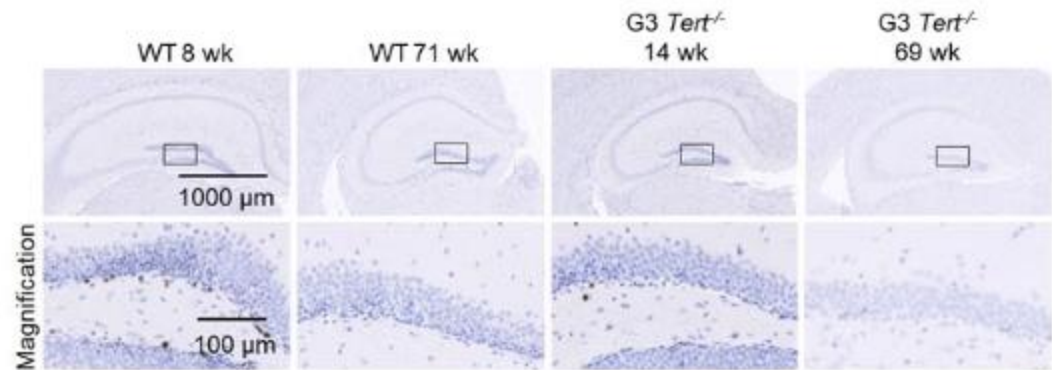
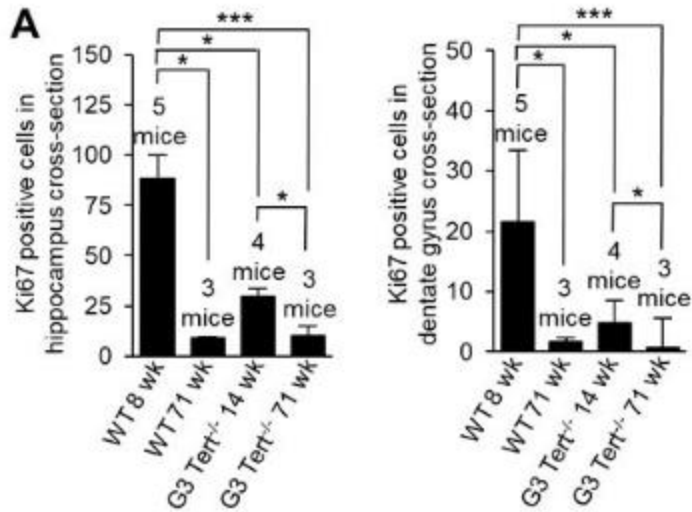
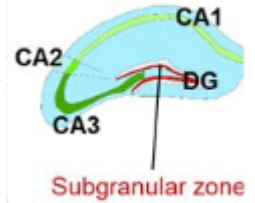
Mice deficient for telomerase have shorter telomeres in hippocampus

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase



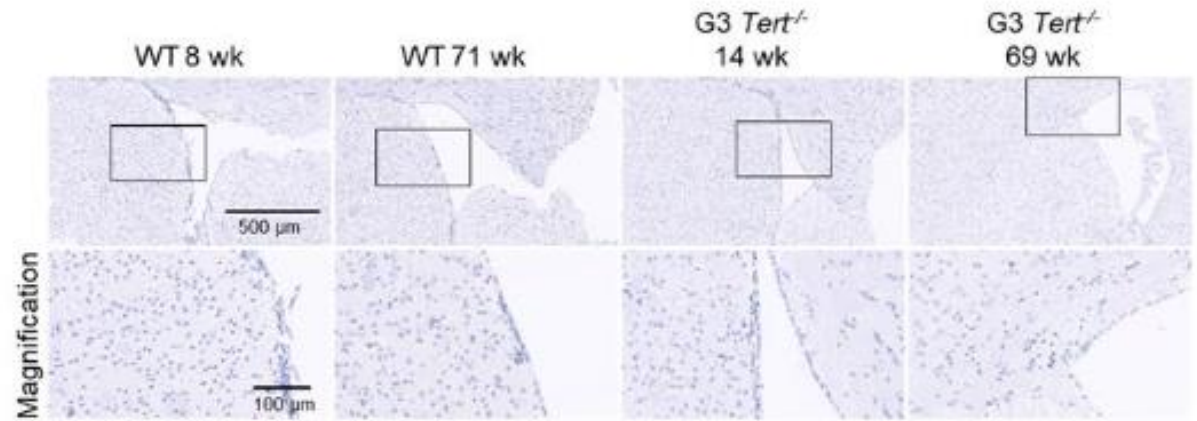
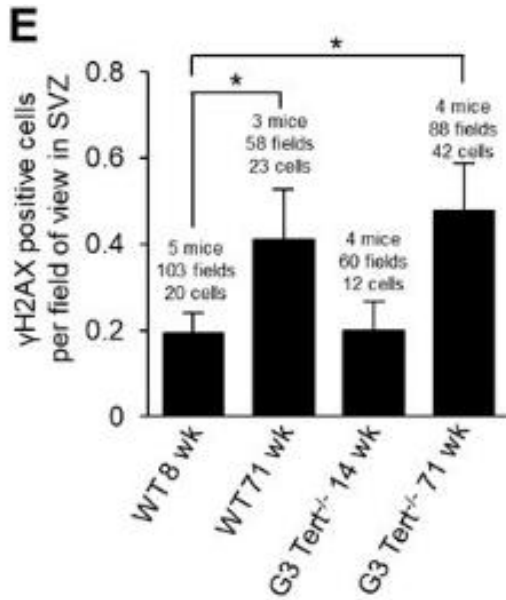
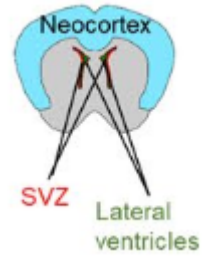
Mice deficient for telomerase have shorter telomeres in SVZ and neocortex

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase

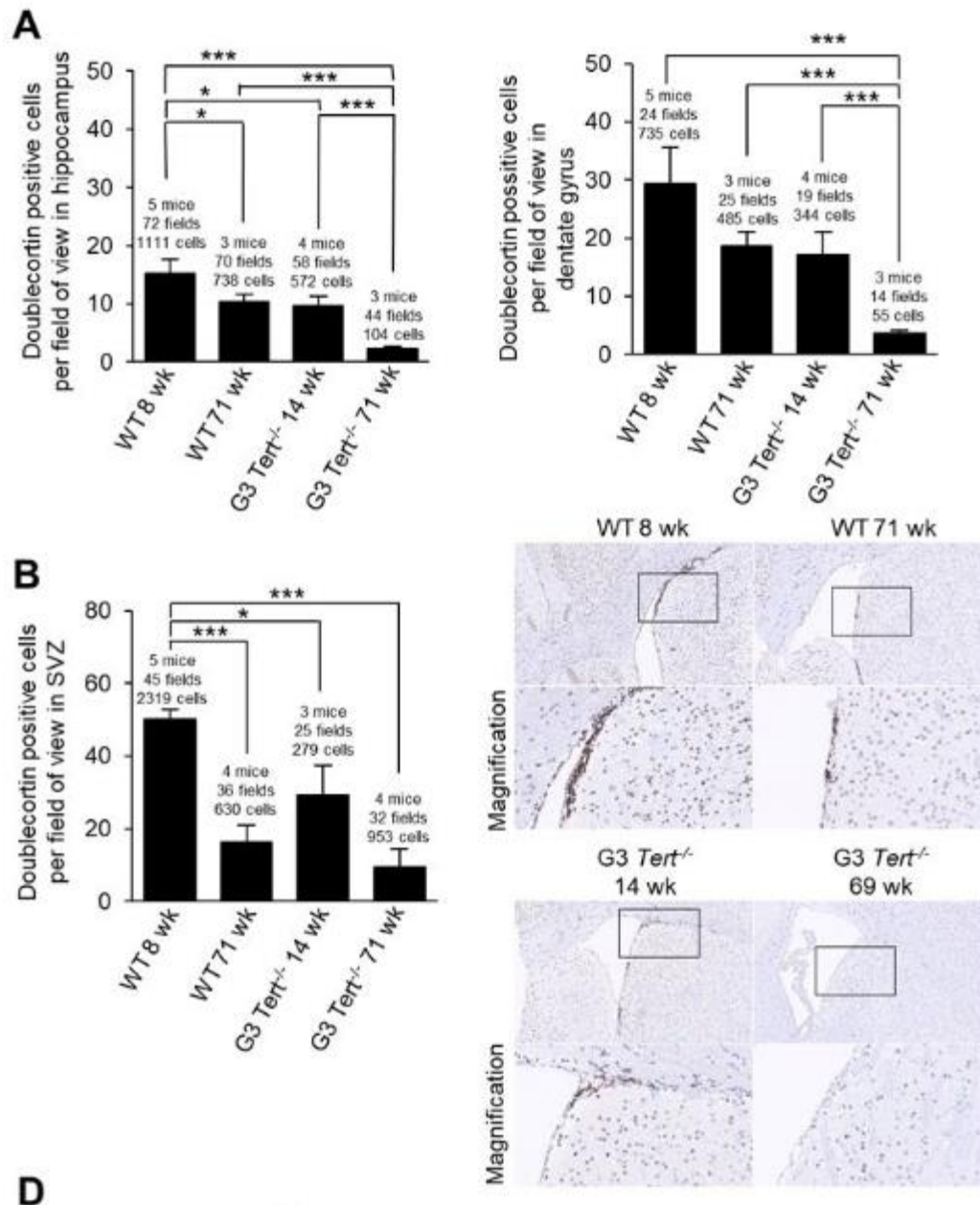


Mice deficient for telomerase have less proliferation.

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase

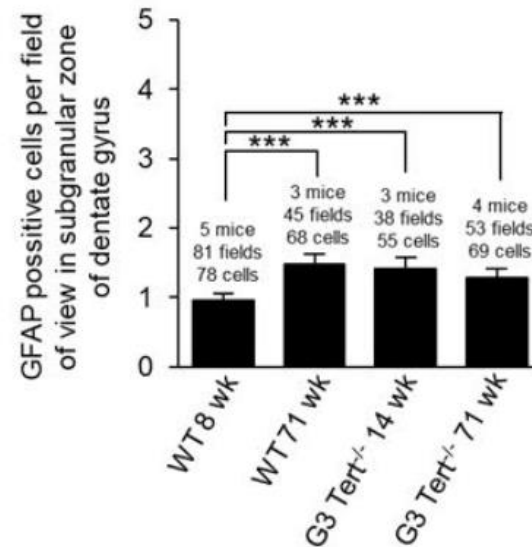
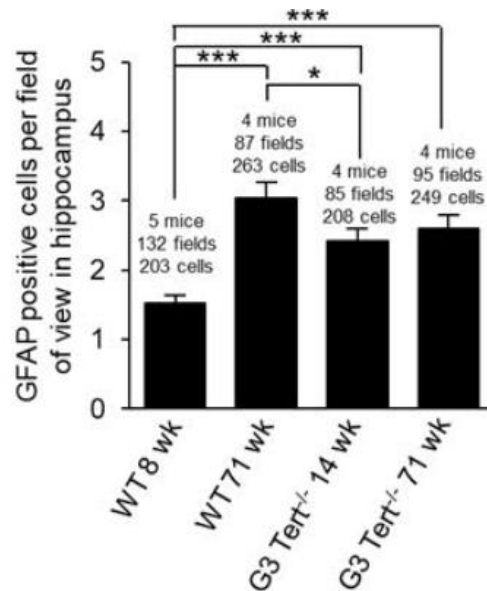
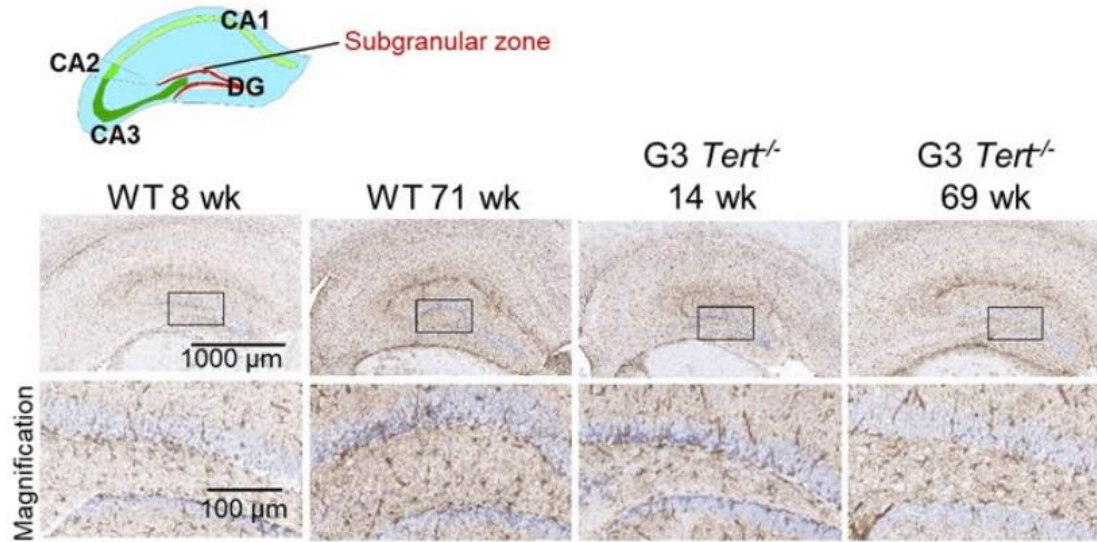


Mice deficient for telomerase have more DNA damage.



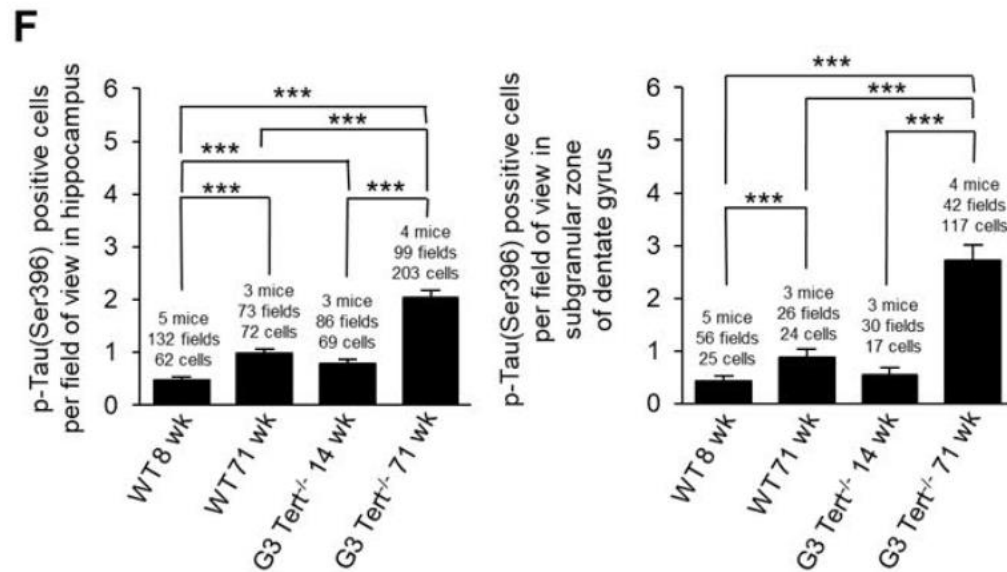
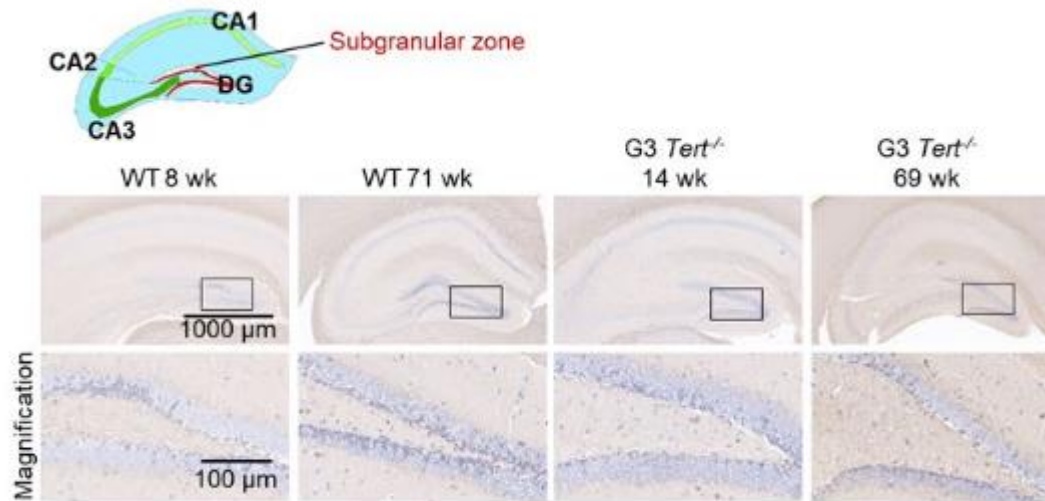
Mice deficient for telomerase have less neurogenesis.

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase



Augmentation de la neuroinflammation

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase



Accumulation de Tau avec l'âge pour les WT et KO

# Caractérisation des souris KO pour Télomérase

In summary:

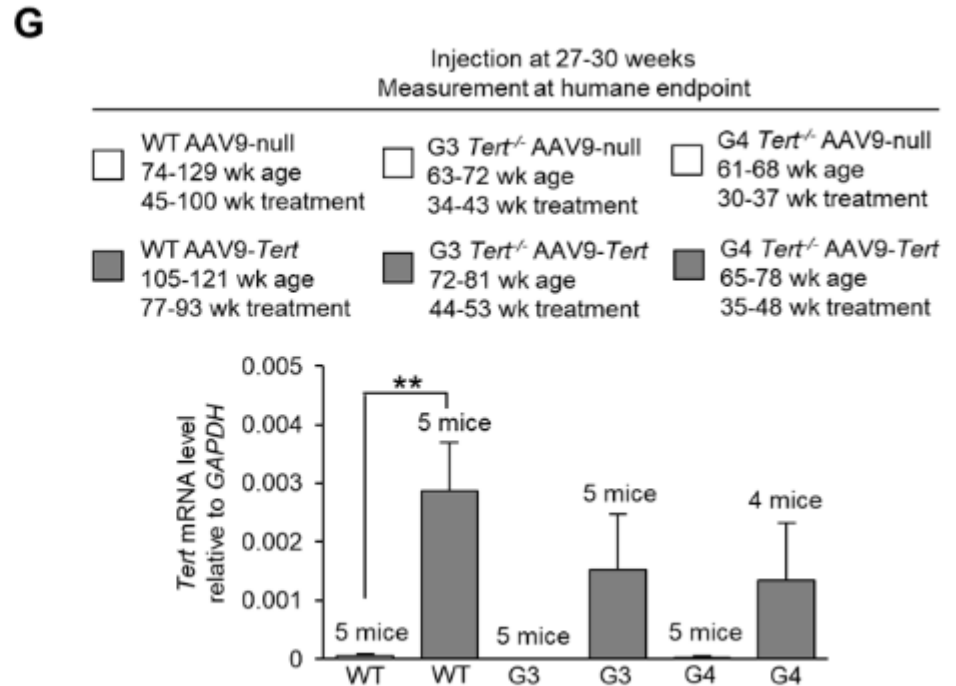
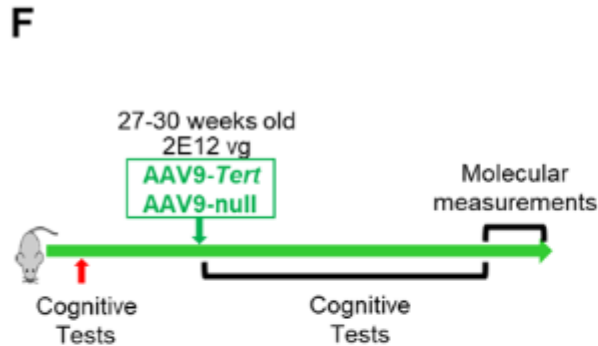
Short telomeres in the brain contribute to

- Impair brain neurogenesis
- Increase neuroinflammation
- Increase abnormal tau phosphorylation

Similar phenotypes were observed associated to physiological aging in very old wild type mice



# Thérapie génique AAV9-Tert chez WT et KO

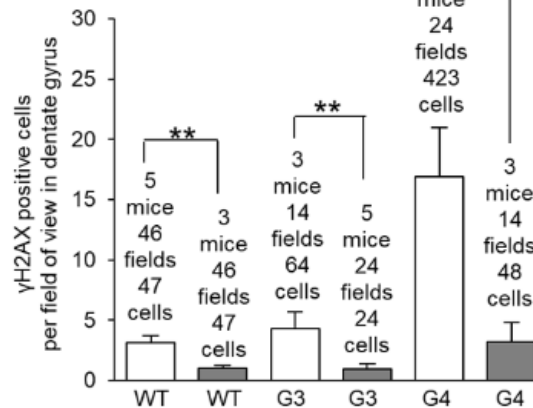
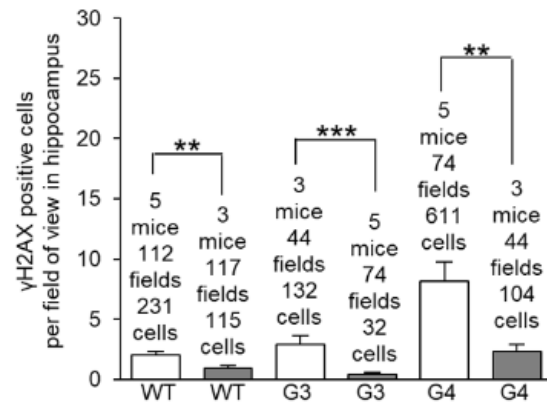
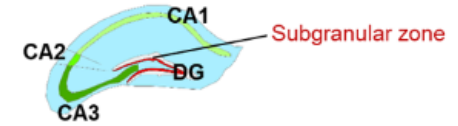
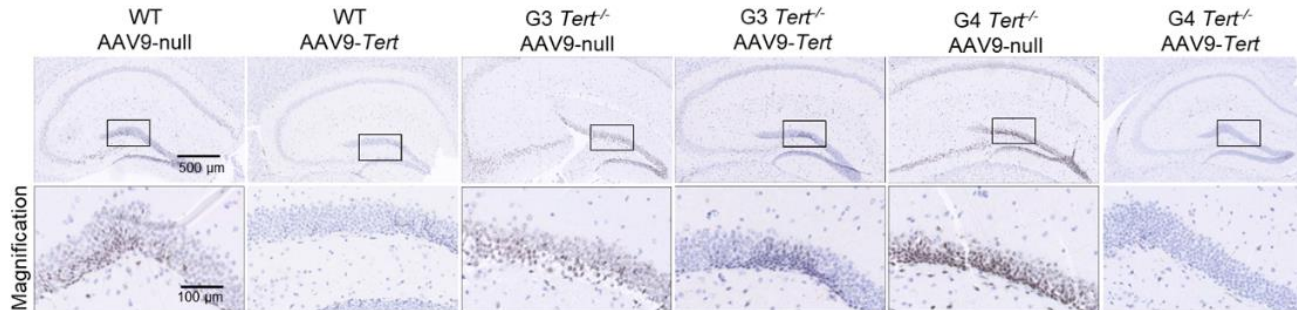
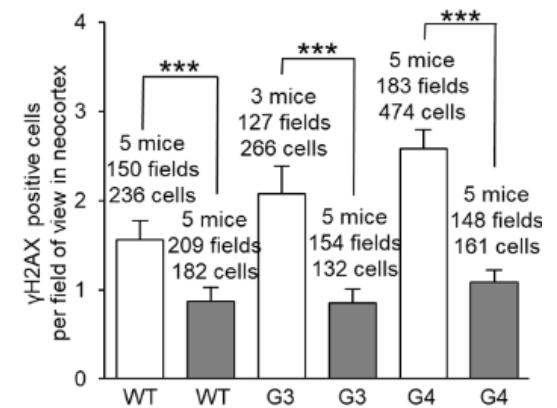


Increased Tert mRNA expression in the brains of mice transduced with the AAV9-Tert vectors compare to the null-vectors

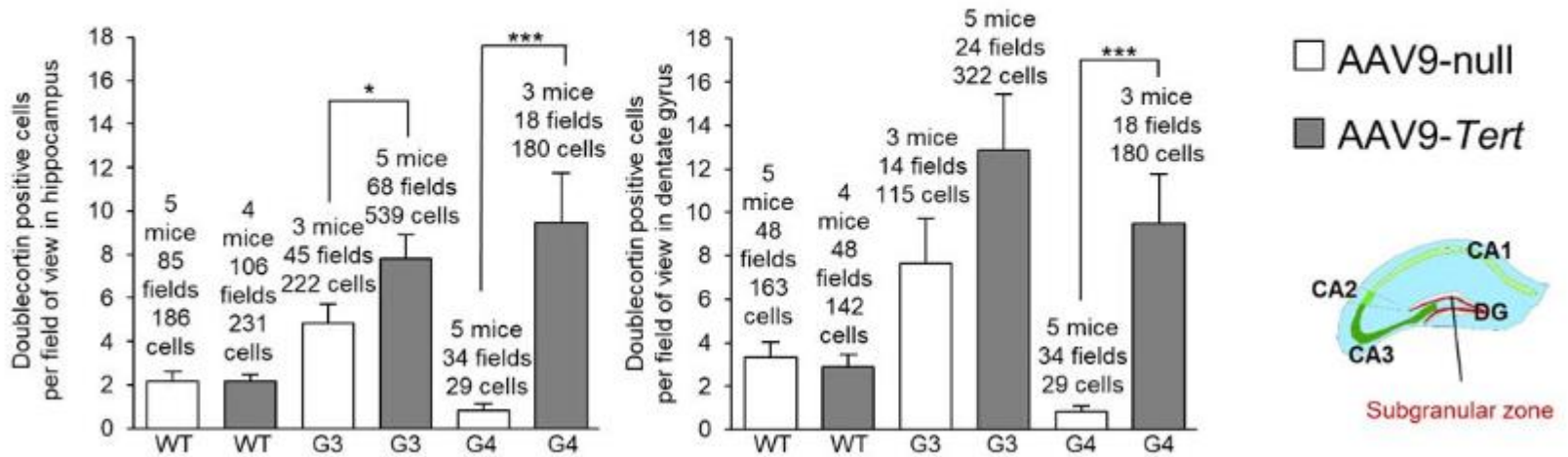
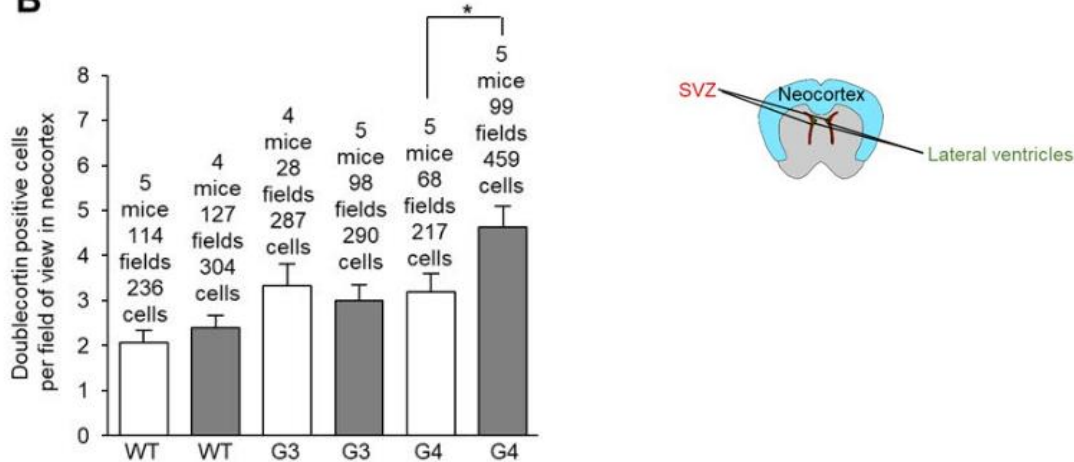
**A**

Injection at 27-30 weeks

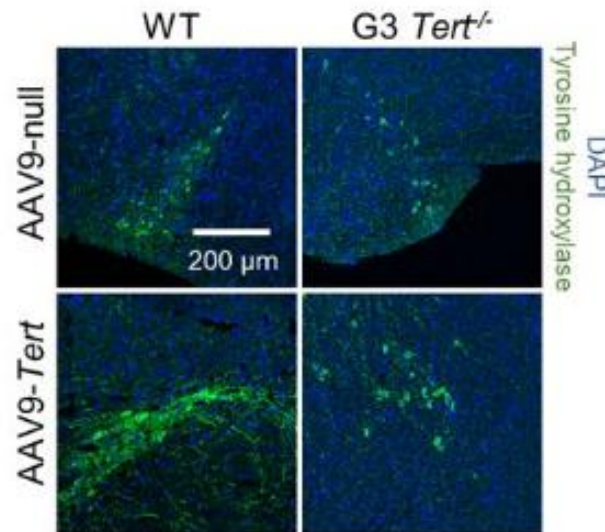
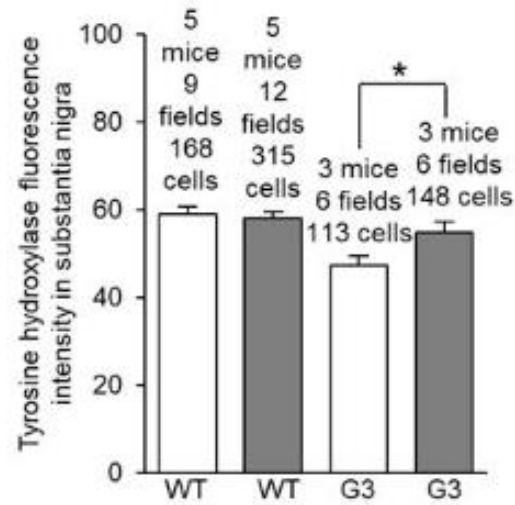
□ WT AAV9-null 74-129 wk age 45-100 wk treatment	□ G3 <i>Tert</i> <sup>-/-</sup> AAV9-null 63-72 wk age 34-43 wk treatment	□ G4 <i>Tert</i> <sup>-/-</sup> AAV9-null 61-68 wk age 30-37 wk treatment
■ WT AAV9- <i>Tert</i> 105-121 wk age 77-93 wk treatment	■ G3 <i>Tert</i> <sup>-/-</sup> AAV9- <i>Tert</i> 72-81 wk age 44-53 wk treatment	■ G4 <i>Tert</i> <sup>-/-</sup> AAV9- <i>Tert</i> 65-78 wk age 35-48 wk treatment

**B**

Treatment with AAV9-*Tert* results in less damage in the brain

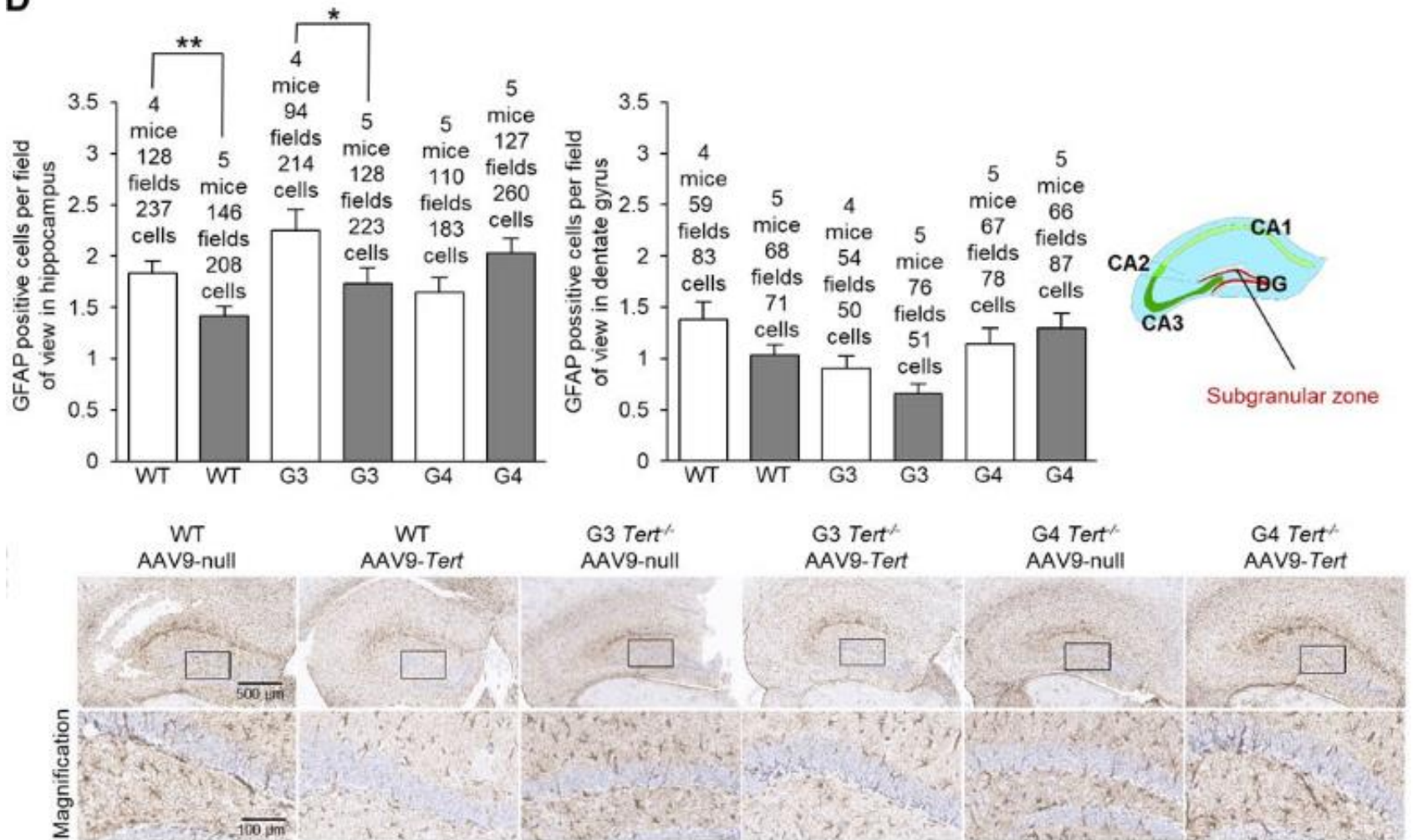
**A****B**

Treatment with AAV9-Tert results in more neurogenesis in the brain

**C**

Treatment with AAV9-Tert results in more dopaminergic neurons in SN

**D**

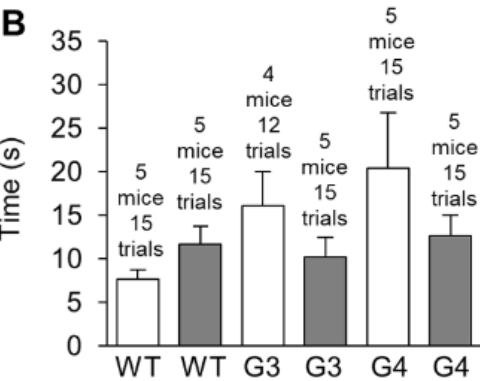
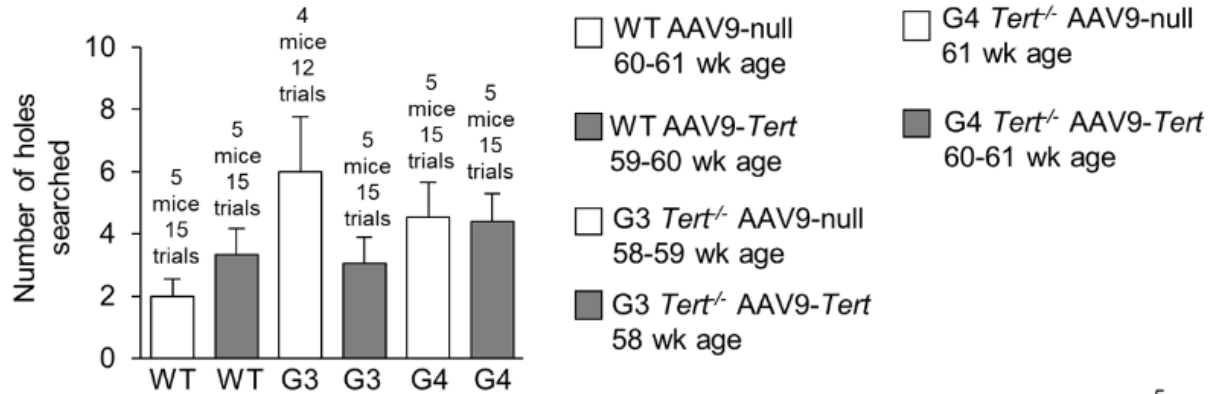


Treatment with AAV9-Tert results in less inflammation in the brain.

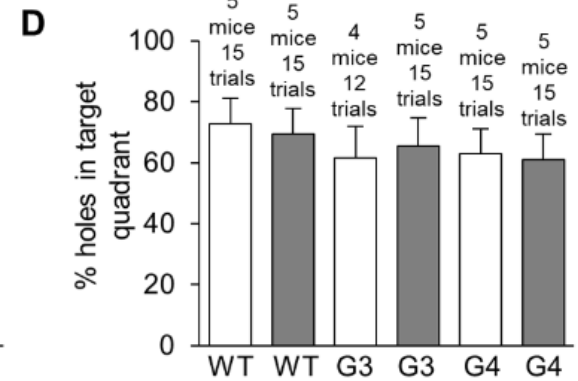
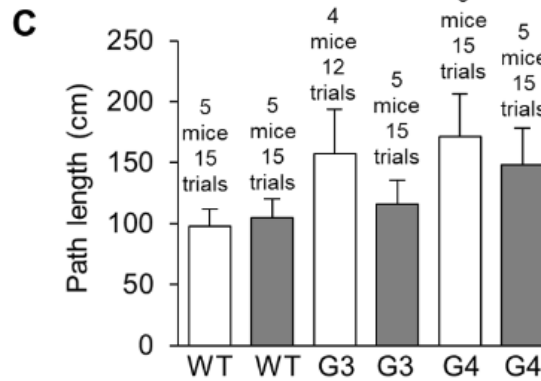
# Effect of gene therapy on memory

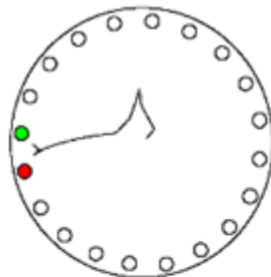
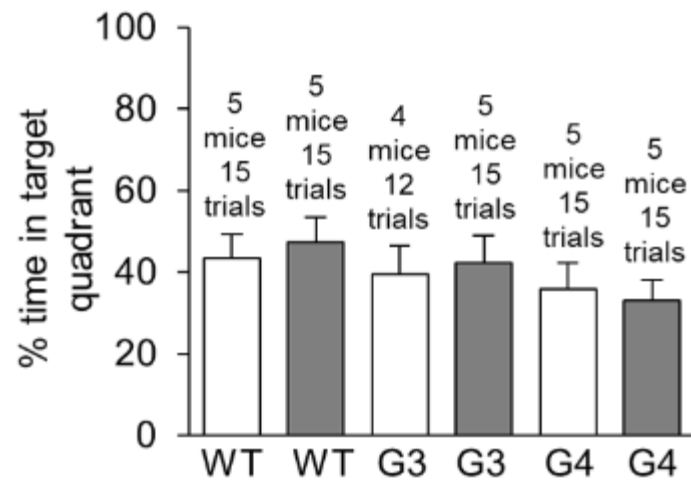
Barnes maze

30 weeks of treatment

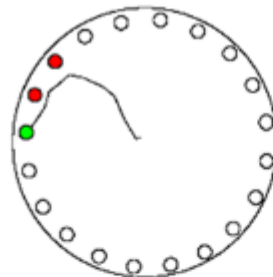


\*\*Chi-squared  
p-value: 0.00876

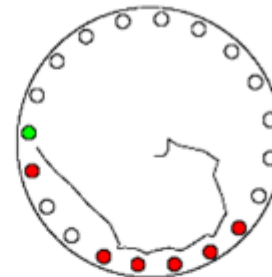




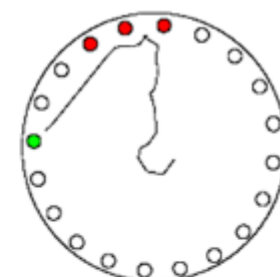
WT AAV9-null  
60 wk



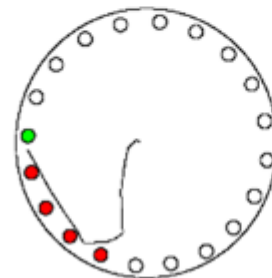
WT AAV9-Tert  
59 wk



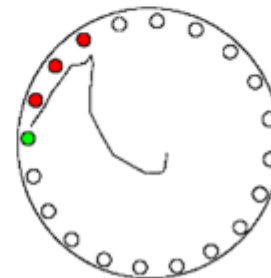
G3 *Tert*<sup>-/-</sup> AAV9-null  
59 wk



G3 *Tert*<sup>-/-</sup> AAV9-Tert  
59 wk



G4 *Tert*<sup>-/-</sup> AAV9-null  
61 wk



G4 *Tert*<sup>-/-</sup> AAV9-Tert  
60 wk

The performance of the AAV9-Tert groups was better than AAV9-null groups