



HAL
open science

Rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité par la voie DAF-2/Insuline/IGF-1 chez *Caenorhabditis elegans*

Caroline Araiz

► **To cite this version:**

Caroline Araiz. Rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité par la voie DAF-2/Insuline/IGF-1 chez *Caenorhabditis elegans*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2008. Français. NNT : . tel-00347920

HAL Id: tel-00347920

<https://theses.hal.science/tel-00347920>

Submitted on 17 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc
UFR Sciences

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Montpellier II

Discipline : génétique et biologie moléculaire

Formation Doctorale : Biologie Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement

le 1er juillet 2008

par

Caroline ARAIZ

Titre :

Rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité par la voie DAF-2/Insuline/IGF-1 chez *Caenorhabditis elegans*

Directeur de thèse :

Pr Simon Galas

Jury composé de :

Mme. le Dr Anne Debant, Directeur de Recherche, CRBM, Montpellier

M. le Dr Renaud Legouis, Chargé de Recherche, CGM, Gif-sur-Yvette

M. le Dr Eric Le Bourg, Chargé de Recherche, CRCA, Toulouse

M. le Pr Etienne Emile Baulieu, Professeur, Collège de France, Paris

Mme. le Pr Annie Sainsard-Chanet, Professeur, Université Paris Sud

M. le Pr Simon Galas, Professeur, Université Montpellier I

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinatrice

Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc
UFR Sciences

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Montpellier II

Discipline : génétique et biologie moléculaire

Formation Doctorale : Biologie Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement

le 1er juillet 2008

par

Caroline ARAIZ

Titre :

Rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité par la voie DAF-2/Insuline/IGF-1 chez *Caenorhabditis elegans*

Directeur de thèse :

Pr Simon Galas

Jury composé de :

Mme. le Dr Anne Debant, Directeur de Recherche, CRBM, Montpellier

M. le Dr Renaud Legouis, Chargé de Recherche, CGM, Gif-sur-Yvette

M. le Dr Eric Le Bourg, Chargé de Recherche, CRCA, Toulouse

M. le Pr Etienne Emile Baulieu, Professeur, Collège de France, Paris

Mme. le Pr Annie Sainsard-Chanet, Professeur, Université Paris Sud

M. le Pr Simon Galas, Professeur, Université Montpellier I

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements.....	8
Avant-propos.....	11
Introduction.....	15
I. Les théories du vieillissement.....	16
I. 1. Vieillessement et longévité : définitions.....	16
I. 2. Exemples de théories du vieillissement.....	17
I. 2. 1. La théorie du rythme de vie ou « the rate-of-living theory of aging »	17
I. 2. 2. Les théories évolutionnistes ou « the evolutionary senescence theory of aging »	18
I. 2. 2. 1. La théorie de l'accumulation des mutations ou « the mutations accumulation theory of aging ».....	18
I. 2. 2. 2. La théorie de la pléiotropie antagoniste ou « the antagonistic theory of aging ».....	19
I. 2. 2. 3. La théorie du soma jetable ou « the disposable soma theory of aging ».....	19
I. 2. 2. 4. La théorie des stress environnementaux et de l'hormésis ou « the ecological stress theory of aging and hormesis ».....	20
I. 2. 3. La théorie des radicaux libres ou « the free radical theory of aging ».....	21
I. 2. 4. La théorie de l'instabilité génomique ou « the genome maintenance hypothesis of aging ».....	22
I. 2. 5. La théorie du raccourcissement des télomères ou « the replicative senescence hypothesis of aging ».....	23
I. 2. 6. La théorie du système neuroendocrinien ou « The neuroendocrine hypothesis of aging ».....	24
II. <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle d'étude du vieillissement. Voies de signalisation impliquées dans la longévité de <i>C. elegans</i>.....	26
II. 1. Régulation de la longévité chez <i>C. elegans</i> par des modifications environnementales.....	27
II. 1. 1. Régulation de la longévité de <i>C. elegans</i> par restriction diététique.....	27
II. 1. 1. 1. Implication du gène <i>sir-2.1</i> dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.....	28

II. 1. 1. 2. Implication de la voie LET-363/TOR dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.....	29
II. 1. 1. 3. Implication de l'AMPK dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.....	30
II. 1. 1. 4. Implication de l'autophagie dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.....	32
II. 1. 1. 5. Implication des facteurs de transcription PHA-4 et SKN-1 dans la régulation de la longévité en conditions de DR.....	34
II. 1. 1. 5. a) PHA-4.....	34
II. 1. 1. 5. b) SKN-1.....	34
II. 1. 2. Régulation de la longévité par exposition à un stress modéré ou hormésis.....	36
II. 2. Régulation de la longévité de <i>C. elegans</i> par des traitements pharmacologiques.....	37
II. 2. 1. Effets de molécules anti-oxydantes sur la longévité de <i>C. elegans</i>	37
II. 2. 1. 1. Effet de l'administration de la vitamine E, de ses dérivés et de l'Ubiquinone.....	38
II. 2. 1. 2. Effet de l'administration de Resvératrol.....	38
II. 2. 1. 3. Effet de l'administration de mimétiques d'enzymes anti-oxydantes.....	40
II. 2. 2. Effet de l'administration d'extraits de plantes contenant un mélange de composés chimiques sur la longévité de <i>C. elegans</i>	40
II. 2. 2. 1. Effet de l'administration d'extrait de myrtilles.....	40
II. 2. 2. 2. Effet de l'administration d'extrait de feuilles de <i>Ginkgo biloba</i>	41
II. 2. 3. Effet de l'administration d'anticonvulsifs sur la longévité de <i>C. elegans</i>	41
II. 2. 4. Effet de l'administration d'antidépresseurs sur la longévité de <i>C. elegans</i>	42
II. 3. Régulation génétique de la longévité de <i>C. elegans</i> : implication de nombreuses voies de signalisation.....	42
II. 3. 1. Régulation de la longévité par les signaux hormonaux émanant de la gonade...42	
II. 3. 2. Régulation de la longévité par des gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	44
II. 3. 3. Le cas particulier du gérontogène <i>old-1</i> dans la régulation de la longévité.....	46
II. 3. 4. Régulation de la longévité par la modulation de la synthèse protéique.....	47
II. 3. 5. Régulation hormonale de la longévité par la voie DAF-2/Ins/IGF-1.....	49
II. 3. 5. 1. Le récepteur DAF-2 et ses mutants hypomorphes.....	52

II. 3. 5. 2. Implication de DAF-16 dans les différents phénotypes des mutants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1.....	57
II. 3. 5. 3. Les co-régulateurs de DAF-16.....	59
II. 3. 5. 3. a) SMK-1.....	59
II. 3. 5. 3. b) HSF-1.....	59
II. 3. 5. 3. c) SIR-2.1.....	60
II. 3. 5. 3. d) BAR-1.....	60
II. 3. 5. 3. e) KRI-1.....	60
II. 3. 5. 3. f) Le cas particulier de SKN-1.....	62
II. 3. 5. 4. Les cibles transcriptionnelles de DAF-16.....	63
II. 3. 5. 5. Importance de l'expression temporelle et spatiale (tissu-spécifique) de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans la régulation de la longévité de <i>C. elegans</i>	64
II. 3. 5. 5. a) Spécificité temporelle de l'expression de la voie DAF-2/Ins/IGF-1...64	
II. 3. 5. 5. b) Spécificité tissulaire de l'expression de la voie DAF-2/Ins/IGF-1....65	
II. 3. 6. Composante stochastique du vieillissement chez <i>C. elegans</i>	66
III. Les protéines 14-3-3.....	70
III. 1. Généralités.....	70
III. 2. Mécanismes d'action des protéines 14-3-3.....	71
III. 3. Cibles des protéines 14-3-3.....	74
III. 4. Régulation des protéines 14-3-3.....	74
III. 5. Les protéines 14-3-3 chez <i>C. elegans</i>.....	75
III. 5. 1. Généralités.....	75
III. 5. 2. Implication de FTT-1 et FTT-2 dans la régulation de la longévité, de la résistance au stress et de la formation des larves dauers	78
III. 5. 2. 1. Interaction des protéines FTT avec DAF-16 et SIR-2.1 et localisation subcellulaire de DAF-16 par les protéines FTT-1 et FTT-2.....	78
III. 5. 2. 2. Régulation de la longévité et de la résistance au stress par FTT-1 et FTT-2..	79
III. 5. 2. 3. Régulation de l'entrée en dauer par FTT-1 et FTT-2....	80
Résultats.....	82
Publication 1.....	83
Discussion et perspectives.....	86

I. Régulation de la longévité de <i>C. elegans</i> par FTT-1 et FTT-2 lors de la période post-reproductive.....	87
I. 1. Régulation positive de la longévité.....	87
I. 2. Régulation positive de la longévité de mutants portant un allèle nul de <i>daf-16</i>...	88
I. 3. Régulation de l'expression basale de gènes de défense contre le stress et régulation de la résistance au stress par les protéines FTT.....	89
I. 3. 1. Stress oxydant.....	89
I. 3. 2. Stress thermique.....	91
I. 4. Régulation positive et différentielle de la longévité de mutants <i>daf-2</i> hypomorphes de classes alléliques différentes.....	93
 II. Implication des protéines FTT dans le développement de <i>C. elegans</i>....	95
II. 1. Régulation de la formation des larves dauers et du rythme de développement..	95
II. 2. Régulation de la mise en place des réserves lipidiques.....	96
II. 3. Régulation de la longévité des animaux adultes par une action lors du développement.....	97
 Annexes.....	101
Publication 2 (en préparation).....	102
Projets en cours : résultats préliminaires.....	106
 Bibliographie.....	114

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM) de Montpellier de 2004 à 2008. Je remercie le Professeur Paul Mangeat de m'avoir accueillie dans son institut durant ces quatre années.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury :
Merci à Anne Debant pour avoir accepté de présider ce jury. Anne, j'ai été très sensible à ton soutien au cours de plusieurs moments difficiles de ma thèse. Sache que tu as toute mon estime et ma gratitude.
Je remercie Renaud Legouis et Eric Le Bourg d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs. J'adresse également mes sincères remerciements aux Professeurs Etienne Emile Baulieu et Annie Sainsard-Chanet pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Simon Galas, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci Simon, de m'avoir donné la chance de faire une thèse quand tout semblait compromis, je t'en suis très reconnaissante. Merci de m'avoir initiée à ce fabuleux modèle qu'est *C. elegans* et de m'avoir transmis ta passion pour ce « coquin » de petit ver. De par tes compétences et ton enthousiasme, tu m'as appris à développer un esprit critique et positif, même si parfois tout n'est pas facile dans la vie d'un scientifique.

Un chaleureux merci au deuxième Simon (Descamps) qui est venu agrandir l'équipe ; tu as amené avec toi un renouveau très appréciable et c'est toujours très sympa de pouvoir discuter avec toi de boulot, mais aussi des petites contrariétés personnelles qui surviennent parfois, même s'il faut l'avouer, à ce sujet, c'est surtout moi qui parle....

Halim, j'ai beaucoup aimé bosser en ta présence, c'est agréable de ne plus être la seule étudiante de l'équipe ! Ta bonne humeur, ton dynamisme et ta curiosité ont eu un effet rafraîchissant sur l'ambiance de travail : ça fait drôlement plaisir de se retrouver en ta compagnie côté labo comme côté bureau (surtout le week-end !). Bonne chance pour la suite !

Une dédicace toute particulière à la seule autre présence féminine de l'équipe, Marythé. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour tes nombreux et précieux conseils, ton soutien et ta disponibilité. Les discussions toujours très constructives que nous avons eues, le temps que tu m'as accordé ces dernières semaines et tes encouragements lors de cette rédaction pleine de stress m'ont été d'une aide inestimable. Merci mille fois !

Je n'oublie pas les stagiaires de Berlin (Julia, Vicky et Nga), qui ont participé au démarrage du projet FTT, et grâce à qui j'ai pu améliorer mon anglais.

Merci aux membres du département « cycle cellulaire » d'avoir écouté mes présentations des réunions du vendredi, alors que le ver n'est pas votre dada.

Merci Thierry pour m'avoir laissé piocher dans les stocks d'enzyme et de réactifs de ton équipe ; merci aussi pour tes conseils et tes blagues qui arrivent toujours quand on s'y attend le moins. Didier, je te remercie aussi pour tes conseils avisés.

Une pensée à l'équipe de May Morris et en particulier aux anciens, Jérôme, Anna, Denis et Marion avant que l'on ne déménage dans nos nouveaux quartiers. C'était agréable de partager le labo avec vous, à l'exception près de vos levures ! ;)

Merci au « club nématode »: Jean-Mi, Anne, Emilie, Gwenaëlle, Mélissa, Simon G, Simon D, Marythé, Halim... Nos réunions mensuelles ont toujours été sources d'enrichissement.

Merci aux membres de la plateforme MRI, pour leur aide en ce qui concerne l'imagerie.

Merci à la joyeuse équipe du café de 10h, Mathieu, Nat, Manu, Franck, Hélène, Sophie, Pauline, Emilie, (et les deux petites nouvelles Salomé et Abigaëlle), qui m'a adoptée il y a quelques temps déjà. Quand le moral est dans les chaussettes, rien de tel qu'une petite pause avec vous et c'est reparti !

Merci aussi aux copains et copines du labo, Julie, Linda, Estelle, Yann, Andrew, Lili, ainsi qu'à tous les autres thésards et thésardes du CRBM, Audrey, Edwige, Valérie, ..., ainsi qu'à tous ceux qui sont déjà partis (Cyril, Julien, Amaury, Jérôme, Corinne, Camille...) et qui ont contribué à la bonne ambiance générale du CRBM, pendant ces quatre dernières années (Ah ! Les pots du vendredi sous les micos...)

Merci également à tous ceux que j'ai rencontrés et côtoyés au CRBM et qui font vivre l'institut. Merci à tous ceux avec qui j'ai sympathisé (ils sont nombreux ! impossible de tous vous citer mais je suis sûre que vous vous reconnaîtrez) et qui ont toujours un petit mot sympa quand on se croise dans les couloirs.

Merci aux amies! Yaël, je t'adore ! On ne se voit pas souvent mais quand ça arrive, c'est toujours comme si on ne s'était jamais quittées ! Tu es toujours présente dans les moments importants et tu as su me soutenir pendant ceux plus difficiles que les autres, merci... et bonne chance pour Philadelphie !

Audrey, ma Chouchoutte, te voir, te lire ou t'entendre me donne toujours du baume au cœur ! Souvent imités, toujours inégalés, ton peps et ta répartie m'ont souvent apporté un regain de bonne humeur et de motivation. Merci !

Chacha, la plus discrète, tu es cependant toujours de bons conseils et ta compagnie est très agréable. Ca va bientôt être ton tour, alors bonne chance !

Steph la mendoise, tu as toujours été là dans les bons moments et dans les moins bons, ton amitié compte beaucoup pour moi.

À mon serveur officiel de boisson gazeuse, mon Mat de platine, ma sous-unité tantôt régulatrice, tantôt catalytique (dixit Thierry), mon Chouchou, MERCI ! Je ne peux pas dire ici tout ce que tu m'as apporté, d'abord en tant que « collègue », puis ami et enfin ce que tu m'apportes aujourd'hui comme petit ami. Merci pour ta patience à toutes épreuves, ton soutien permanent dans les petits maux, comme dans les grands moments de panique (notamment lors de la rédac !) et dans les nombreux « craquages ». Tu es formidable et j'espère que je serai à la hauteur quand ton tour viendra. JTM.

D'une façon générale, merci à ma famille, cette grande tribu qui me considère comme une « boule » alors que je me tue à lui dire que je ne suis « qu'une thésarde parmi tant d'autres » ! Merci de manifester ce vif intérêt pour mon travail sur le « ver de terre » et de me consoler quand le moral flanche.

Finalement, j'aimerais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes parents, pour leurs constants encouragements durant ses longues années d'études. Je vous dois beaucoup, votre soutien sans faille, même lors de périodes de stress aiguë, m'a permis de garder le cap, je vous remercie du fond du cœur pour votre confiance.

Avant-propos

***C. elegans* comme modèle en biologie.**

L'aventure commence en Angleterre en 1974, quand Sydney Brenner met *Caenorhabditis elegans* sur le devant de la scène. Ce scientifique, après avoir participé à la découverte de l'ARN messager et du code génétique avec François Jacob et Francis Crick au début des années soixante [1], est à la recherche d'un modèle simple mais suffisamment évolué (jusque là, il étudiait la génétique chez les bactéries et les bactériophages) qui lui permettrait, par une approche génétique, de comprendre les mécanismes conduisant à l'élaboration d'un organisme multicellulaire et au fonctionnement de son système nerveux. Parmi les modèles utilisés à cette époque, *Drosophila melanogaster* comporte 10^5 neurones, ce qui rend l'étude du développement du système nerveux très fastidieuse. Son choix s'oriente alors vers *C. elegans*. Ce nématode ne possède que 302 neurones et présente de nombreux autres avantages : son cycle de reproduction et sa durée de vie sont courts, son mode de reproduction est principalement hermaphrodite et, enfin et surtout, ce petit ver est transparent, facilitant ainsi la description des divisions et différenciations cellulaires au cours de l'embryogénèse et de l'organogénèse par observation au microscope Nomarski. C'est ainsi que ce ver rond d'un millimètre de long est introduit comme organisme de choix dans l'étude des bases moléculaires de la génétique en 1974 par Sydney Brenner, qui publie la première carte génétique des six chromosomes du nématode [2]. Ses travaux complétés par ceux de ses collègues John Sulston et Robert Horvitz concernant le lignage cellulaire de *C. elegans* et les gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée [3-7] sont couronnés de succès et récompensés par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2002 [8, 9]. Les lauréats ont aussi montré qu'il existe des gènes analogues à ceux de *C. elegans* chez les organismes supérieurs, y compris chez l'Homme. Cette découverte a donc motivé l'utilisation de cet animal dans l'exploration de beaucoup d'autres procédés biologiques. L'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine en 2006 à Craig Mello et Andrew Fire pour leurs recherches sur le mécanisme d'interférence ARN, ou comment diminuer l'expression d'un gène chez *C. elegans* (mécanisme alors seulement connu chez les plantes comme « système immunitaire ») prouve une fois de plus que le nématode constitue un modèle de choix dans l'étude de la physiologie.

Par ailleurs, *C. elegans* est utilisé comme modèle d'étude du vieillissement humain et des maladies associées [10, 11] ainsi que d'autres pathologies telles que les maladies mitochondriales [12] et les dystrophies musculaires [13].

Les avantages de l'utilisation de *C. elegans*.

L'utilisation de *C. elegans* comme modèle d'étude présente de nombreux avantages. Tout d'abord parce que c'est un animal facile à élever en laboratoire : sa petite taille permet une culture intensive sur de simples boîtes d'Agar et sa nourriture se résume à une souche d'*Escherichia coli*, ce qui réduit les coûts d'utilisation de ce modèle.

Des cultures liquides en fermenteurs permettent une production de masse pour des analyses biochimiques. Son temps de génération est court (3,5 jours à 20°C) et sa descendance est nombreuse (environ 300 embryons par hermaphrodite). L'existence des deux sexes constitue un atout pour la génétique : les hermaphrodites, qui sont majoritaires, se reproduisent par autofécondation et permettent ainsi le maintien des souches homozygotes. Les mâles, que l'on peut obtenir facilement, sont utilisés dans les croisements pour introduire une nouvelle mutation.

La transparence de *C. elegans* favorise l'observation de son anatomie [14], avantage qui a d'ailleurs permis la détermination de son lignage cellulaire complet par les observations minutieuses de Sulston *et al.* en 1983 [5]. Cette caractéristique offre également l'atout considérable de suivre « en direct » le devenir de transgènes couplés à des fluorophores

De plus, cet animal constitué seulement de 959 cellules pour les hermaphrodites et 1031 pour les mâles, possède un génome de petite taille (1.000.000 bp et 19000 gènes) qui a été le premier génome d'un organisme multicellulaire entièrement séquencé en 1998 [15], facilitant ainsi les croisements génétiques.

En plus de toutes ces caractéristiques qui rendent l'utilisation de *C. elegans* comme modèle d'étude déjà très attractive, s'ajoute le libre accès à de nombreuses bases de données, parmi lesquelles le Caenorhabditis Genetic Center (CGC) qui, entre autres, collectionne, maintient et distribue les souches de *C. elegans*, Wormbase, le *Caenorhabditis elegans* Web Server, WORMATLAS, Wormbook qui tiennent à jour des informations précises concernant la génétique, la génomique et la biologie de *C. elegans* et de quelques nématodes apparentés ainsi que le *C. elegans* Gene Knockout Consortium, qui a pour mission de faciliter la recherche génétique sur ce modèle par la production de mutants de délétion de différents gènes.

De plus, la possibilité d'obtenir par micro-injection des animaux transgéniques surexprimant un gène donné ou au contraire de diminuer aisément l'expression de ce même gène grâce l'approche de RNA interférence, particulièrement simple chez *C. elegans* (micro-injection, « soaking » ou « feeding »), facilite la détermination de la fonction d'un gène chez *C. elegans*.

D'autre part, la conservation de mécanismes fondamentaux depuis *C. elegans* jusqu'à l'Homme et les 67% d'homologie qui nous rapprochent de cet organisme, constitue une motivation supplémentaire pour son utilisation comme organisme modèle.

C. elegans s'est notamment révélé être un outil de choix dans la détermination des bases génétiques du vieillissement [11, 16]. Près d'une centaine de gènes impliqués dans la longévité ainsi que dans des maladies humaines liées à l'âge ont été identifiés grâce à ce nématode [11]. Parmi les différentes voies de signalisation mises en œuvre dans la régulation de la longévité de *C. elegans*, la voie de l'insuline/IGF-1, dont le mode d'action et la régulation ont été identifiés chez cet organisme [17, 18], occupe une place centrale. De plus, elle constitue une cascade de signalisation très conservée depuis la levure jusqu'à l'Homme chez qui elle semble également moduler la durée de vie [19].

Ainsi, l'étude de cette voie chez *C. elegans* offre la possibilité de mieux comprendre certains des mécanismes régissant le vieillissement chez d'autres espèces et notamment chez l'Homme.

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressée à la régulation de la voie de l'insuline/IGF-1 ou voie DAF-2/Ins/IGF-1 chez *C. elegans*. L'effecteur principal de cette voie est le facteur de transcription DAF-16 [20], dont la localisation subcellulaire est régulée par des protéines adaptatrices, les protéines 14-3-3. Mes travaux ont eu pour but de déterminer l'impact de la régulation de DAF-16 par les protéines 14-3-3 sur la longévité de *C. elegans*.

« Vieillir est encore le seul moyen qu'on ait trouvé de vivre longtemps ».

Charles Augustin Sainte Beuve

« Tout le monde désire vivre longtemps, mais personne ne voudrait être vieux ».

Jonathan Swift

« Il reste beaucoup du ver en nous ».

Friedrich Nietzsche

INTRODUCTION

I. Les théories du vieillissement.

I. 1. Vieillessement et longévité : définitions.

Avant d'aborder les théories du vieillissement, encore appelé sénescence, il faut commencer par préciser le sens du terme vieillissement. Malheureusement, il est difficile de proposer un énoncé unique car le concept de vieillissement peut être considéré de différentes façons en fonction des changements sociaux, comportementaux, physiologiques, morphologiques, cellulaires et moléculaires qu'il regroupe. D'un point de vue biologique, ce phénomène correspond au déclin progressif et généralisé des fonctions d'un organisme, rendant celui-ci plus vulnérable aux agressions extérieures et l'exposant donc davantage au risque de maladies et de décès [21]. Une définition plus simpliste le qualifie de processus lent et progressif, débutant à la naissance et s'achevant par la mort [22].

L'évocation du vieillissement s'accompagne souvent de celle de la longévité d'un individu. Ce terme regroupe deux concepts différents : la durée de vie moyenne et la durée de vie maximale. La durée de vie moyenne se définit statistiquement comme l'espérance de vie moyenne au moment de la naissance des individus d'une espèce donnée, et tient compte des taux de mortalité observés dans une population en fonction des tranches d'âge. La durée de vie maximale correspond à l'âge maximal qui a pu être atteint par un individu de cette espèce [23]. La valeur de ces deux paramètres peut être très différente et illustre le fait que le vieillissement de tout individu se trouve non seulement sous l'influence de facteurs génétiques propres à son espèce mais aussi de facteurs environnementaux qui modifient la longévité individuelle.

Le phénomène de vieillissement intervient de façon universelle chez tous les êtres vivants. La durée de vie moyenne au sein du règne animal est pourtant loin d'être homogène puisque par exemple, la tortue géante des Seychelles vit en moyenne cinquante ans, une abeille d'été a une durée de vie moyenne de trente-cinq jours et une souris d'environ deux ans. Il semblerait cependant que l'hydre *Hydra vulgaris*, un cnidaire hydrozoaire d'eau douce qui vit exclusivement sous forme de polype, échappe au processus de sénescence, car cet organisme n'a montré à ce jour aucun signe apparent de détérioration [20]. Cette immortalité potentielle serait due au perpétuel renouvellement de tous ses types cellulaires, y compris de ses neurones ; il est d'ailleurs estimé qu'en quatre ans, une hydre remplace l'intégralité de ses cellules au moins soixante fois [20] ! Cependant, cet animal singulier demeure l'exception qui confirme la règle car l'évolution a vu l'essor du phénomène de vieillissement depuis les organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères supérieurs.

I. 2. Exemples de théories du vieillissement.

La volonté de comprendre les raisons et les mécanismes à l'origine du vieillissement a conduit les chercheurs à mener de nombreuses études sur les altérations survenant avec l'âge. L'ensemble des observations réalisées a conduit à l'élaboration de plus de trois cents théories sur le processus de vieillissement, certaines se recoupant, d'autres s'affrontant [24]. Ces théories permettent aux chercheurs d'orienter leurs investigations. De nouvelles études viennent perpétuellement soutenir ou démentir ces différentes théories sans pour autant permettre de dégager un consensus quant aux causes exactes du vieillissement ; un seul concept semble désormais évident : le vieillissement résulte de l'intervention de multiples facteurs autant environnementaux que génétiques.

Voici quelques-unes des théories du vieillissement parmi les plus répandues et les plus étudiées.

I. 2. 1. La théorie du rythme de vie ou « the rate-of-living theory of aging ».

C'est probablement l'une des plus anciennes explications avancées pour justifier le vieillissement. Proposée par Raymond Pearl dans les années 1920, cette théorie s'inspire d'un constat fait chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis. elegans*: le développement et la durée de vie de ces animaux sont inversement corrélés à la température d'élevage. Pearl propose l'interprétation simple selon laquelle, à des températures plus élevées, la cinétique des réactions biochimiques, autrement dit le métabolisme (processus de vieillissement inclus), étant plus rapide à des températures plus élevées, la durée de vie est par conséquent plus courte. Ainsi, cette théorie propose l'existence d'un « pool » énergétique fixe, déterminé au sein de chaque cellule, à la naissance de l'organisme; la vitesse de sénescence, et par conséquent la durée de vie de l'organisme, seraient fonction du rythme auquel il utilise cette réserve, dont l'épuisement total se solderait par la mort de l'organisme [25].

Cependant, de nombreuses preuves expérimentales apportées par les mêmes modèles ont conduit à réfuter cette théorie. Par exemple, de brèves expositions à des températures élevées permettent d'augmenter la longévité de *D. melanogaster* [26]. Chez *C. elegans*, l'extension de la durée de vie de mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale [27], ne s'accompagne pas pour autant d'une réduction de leur métabolisme [28, 29]. Par ailleurs, le fait qu'au sein d'une population isogénique, maintenue dans un environnement homogène, la longévité puisse néanmoins varier d'un individu à l'autre, prouve également que des mécanismes, autres que le

rythme métabolique, sont en jeu pour déterminer la durée de vie des animaux [30]. C'est pourquoi, bien que le métabolisme puisse influencer la durée de vie d'un organisme, la « théorie du rythme de vie » n'a pas été retenue comme suffisante pour expliquer le phénomène de vieillissement.

I. 2. 2. Les théories évolutionnistes ou « the evolutionary senescence theory of aging ».

La longévité d'individus appartenant à différentes espèces et parfois même, regroupés au sein d'une espèce, est très disparate. Ce constat a conduit à penser que la sénescence se trouve sous l'influence des gènes [10].

La première théorie basée sur des principes génétiques est issue du travail d'August Weismann à la fin du XIX^{ième} siècle [31]. Il postule alors que le vieillissement a été programmé dans l'évolution afin que le déclin des parents évite à leurs descendants d'être en compétition avec eux pour les mêmes ressources ; autrement dit que la sélection naturelle a retenu des gènes qui ont pour mission de faire vieillir puis mourir les individus, pour qu'un renouvellement se mette en place. Populaire pendant plusieurs dizaines d'années, cette théorie fut finalement rejetée par la communauté scientifique et par Weismann lui-même, qui préféra penser que les différents êtres vivants étaient au contraire programmés pour la survie et la reproduction. Par la suite, le concept de vieillissement programmé par l'évolution voit émerger de nouvelles théories.

I. 2. 2. 1. La théorie de l'accumulation des mutations ou « the mutations accumulation theory of aging ».

En 1952, Peter Medawar postule que toute mutation délétère apparaissant pendant le développement des individus d'une espèce est soumise à une sélection naturelle drastique afin de favoriser la reproduction de cette espèce. En revanche, une apparition tardive de cette mutation, au cours de la période post-reproductive, échappe à la sélection naturelle. Ainsi, le vieillissement résulterait d'une accumulation de mutations aléatoires et nuisibles survenant à un âge plus avancé [32, 33].

I. 2. 2. 2. La théorie de la pléiotropie antagoniste ou « the antagonistic theory of aging ».

Quelques années plus tard, George Williams extrapole la théorie de Medawar en apportant la notion de pléiotropie génétique. Il propose que les gènes retenus par la sélection naturelle, en raison de leurs effets bénéfiques précoces sur la reproduction des individus d'une espèce, sont susceptibles de présenter des effets antagonistes néfastes une fois la période de reproduction terminée, quand la sélection n'a plus de raison d'être ; il définit ainsi la sénescence comme la conséquence malheureuse d'une adaptation favorable, plus tôt au cours de la vie de l'individu [34]. Toutefois, à ce jour, il n'a été mis en évidence aucun gène ayant des fonctions pléiotropiques antagonistes dans un contexte physiologique (sans dérégulation) et ce concept n'explique pas le caractère progressif du vieillissement à partir de l'âge adulte.

I. 2. 2. 3 La théorie du soma jetable ou « the disposable soma theory of aging ».

Enoncée par Thomas Kirkwood, cette théorie reprend l'idée de la sélection naturelle précoce en faveur de la reproduction de l'espèce. Sur ce principe, la reproduction a un coût : le « sacrifice » de l'enveloppe somatique ; en effet, cette théorie propose que les ressources de l'organisme sont préférentiellement investies dans la reproduction, ce qui se fait donc au détriment de la réparation des dommages stochastiques que peut subir le soma au cours du temps. Par conséquent, celui-ci connaît une détérioration intrinsèque, correspondant au vieillissement, causée par l'accumulation de mutations somatiques [35, 36]. Kirkwood introduit également dans sa théorie la notion de « chance », vis à vis des aléas de la vie tels que les accidents, paramètre aléatoire auquel il attribue une influence primordiale dans l'altération du soma [37, 38]. De ce point de vue, la sénescence n'est donc pas le résultat de l'action directe et nuisible de gènes, mais constitue au contraire une conséquence passive, qualifiée de négligence génétique, qui intervient dès que les ressources doivent être mobilisées en réponse à la pression de sélection.

Les travaux conduits par Steven Austad sur des opossums fournissent des résultats intéressants en faveur de cette théorie. Son étude montre qu'un environnement hostile, par exemple en raison de la présence de prédateurs, exerce une pression de sélection privilégiant une reproduction précoce et par conséquent une durée de vie courte des individus alors que c'est le contraire dans des conditions plus sûres de captivité [39].

Par ailleurs, la théorie de Kirkwood pourrait également expliquer pourquoi des animaux tels que les saumons du Pacifique ou certains types d'araignées ne se reproduisent qu'une seule

fois et meurent. Si la probabilité de survie de ces animaux jusqu'à la saison de reproduction suivante est faible, la sélection naturelle va favoriser la mobilisation maximale des ressources pour la reproduction, n'en gardant aucune pour la maintenance somatique.

En outre, cette théorie est extensible au vieillissement d'organismes unicellulaires tels que *Escherichia coli*. Malgré une reproduction asexuée par division symétrique ou fission binaire, donnant naissance à deux cellules-filles identiques en apparence, il a été montré que cette bactérie ségrège préférentiellement ses constituants nouvellement synthétisés vers les nouvelles extrémités ou nouveaux pôles des deux cellules-filles formées lors de cette division, tandis que ses constituants endommagés sont dirigés vers les extrémités pré-existantes ou anciens pôles, issus de divisions antérieures [40]. Or, Stewart *et al.* ont montré que les cellules-filles ayant hérité d'anciens pôles existant depuis plusieurs divisions présentent un développement ralenti, une capacité moindre à se diviser, donc à se reproduire, et une plus grande probabilité de mourir [41]. D'une certaine façon, la reproduction/prolifération de la population de cellules bénéficiant des nouveaux pôles est donc privilégiée mais les cellules portant les anciens pôles en payent le prix : elles vieillissent.

En ce qui concerne l'application de cette théorie à l'Homme, plusieurs études menées chez des humains, ayant pour objectif de déterminer s'il existe un lien entre le nombre d'enfants et la longévité de leur mère, et en particulier une corrélation négative comme le prédit Kirkwood, ont montré des résultats contradictoires, indiquant une corrélation tantôt négative, tantôt positive ou encore aucune relation entre ces deux variables [42].

I. 2. 2. 4. La théorie des stress environnementaux et de l'hormésis ou « the ecological stress theory of aging and hormesis ».

Cette théorie évolutionniste prend en compte les stress environnementaux et le coût énergétique d'une réponse adaptative des organismes. Depuis des conditions extrêmes létales jusqu'à des conditions optimum, les variations environnementales forment un gradient de stress dans lequel le coût énergétique de l'adaptation des organismes est inversement corrélé à l'intensité du stress. S'ils rencontrent des stress de faible intensité, ils mettent ponctuellement en jeu des mécanismes de défenses permettant la réparation et la maintenance ; si, au contraire, ces stress sont trop importants, les défenses ne suffisent pas à y faire face et des altérations irréversibles surviennent.

L'hormésis (du grec hormaïn, "stimuler") se réfère aux effets bénéfiques obtenus par une exposition à un traitement ou à un stress modéré, qui, appliqué à plus forte intensité, cause des

effets délétères [43]. Un stress modéré stimulerait les défenses de l'organisme et les maintiendrait « en alerte » dans l'éventualité d'un autre stress [44] (**Figure 1**).

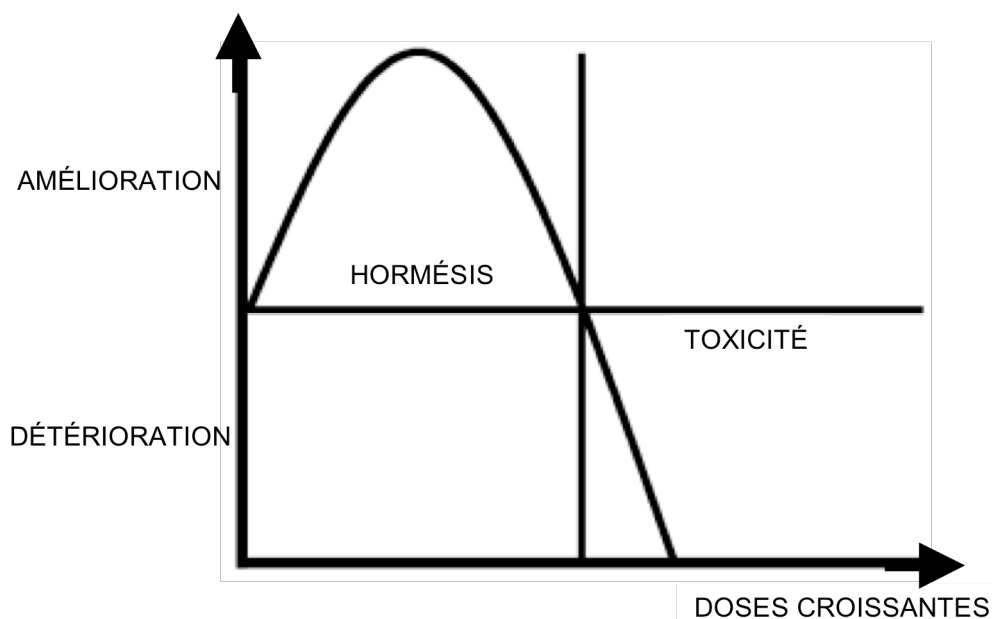


Figure 1: Courbe dose-réponse d'un traitement présentant un effet hormétique. Dans le cas de l'observation de l'effet d'un traitement sur la longévité, de faibles doses ont un effet bénéfique, tandis que des doses plus fortes ont un effet délétère. (D'après [45]).

Dans le contexte de l'évolution, l'hormésis est considérée comme une stratégie de régulation de l'homéostasie des mécanismes de maintenance et de réparation et constitue l'adaptation nécessaire à la survie. Ainsi, dans le gradient de stress défini par la théorie des stress environnementaux, la zone hormétique correspondrait donc à la région optimum de survie des individus couplée à une dépense énergétique raisonnable [46] ; en effet, tout écart vers les extrêmes létaux et l'adaptation qui en découle, représenterait un coût énergétique trop important et favoriserait le vieillissement.

I. 2. 3. La théorie des radicaux libres ou « the free radical theory of aging ».

Il s'agit de la plus répandue et la plus largement étudiée des théories du vieillissement [47]. C'est en 1956 que le biochimiste Denham Harman l'énonce pour la première fois. Il propose que le processus chimique à l'origine du vieillissement résulte de la réaction des radicaux libres, produits normalement par l'organisme par les voies métaboliques utilisant l'oxygène, avec les constituants cellulaires [48] ; ainsi, l'accumulation d'effets délétères sur ces composants augmenterait la probabilité de maladies dégénératives et de décès à mesure

qu'un individu prend de l'âge. En 1972, Harman affine sa théorie, rebaptisée théorie des dommages oxydatifs, en suggérant (i) que la grande majorité des dérivés oxygénés actifs ou ROS (« Reactive Oxygen Species ») (dont certains ne sont pas radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂) sont générés par la mitochondrie et ce, de façon croissante en fonction de l'âge, et (ii) que la durée de vie est déterminée par l'importance des dommages causés à cet organite [49]. Son idée est reprise et plus largement développée par le groupe de Miquel qui suggère que la sénescence résulte de dommages oxydatifs affectant précisément le génome mitochondrial des cellules post-mitotiques [50]. Les mitochondries de ces cellules produisent des ROS qui outrepassent les défenses anti-oxydantes cellulaires et causent ainsi un stress oxydant nocif [51]. Plusieurs études viennent conforter cette hypothèse: Hamilton et ses collaborateurs montrent que le pourcentage de 8-oxo-2-deoxyguanosine (oxo8dG), consécutif aux lésions oxydatives de l'ADN mitochondrial mais aussi nucléaire augmente avec l'âge dans plusieurs tissus murins en raison d'une sensibilité croissante au stress oxydant au cours du temps; leur étude rapporte également que la restriction diététique, connue pour retarder le vieillissement et augmenter la durée de vie des rongeurs [52], prévient cette augmentation dans l'ADN mitochondrial du foie des animaux ainsi que celle d'autres marqueurs d'altérations oxydatives de composants cellulaires (carbonylation des protéines, peroxydation lipidique, produits avancés de glycation) [53].

Toutefois de nombreuses études menées sur différents modèles (*Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, et des modèles murins), visant à évaluer plus directement cette théorie en modulant l'expression d'enzymes anti-oxydantes par invalidation (« knock out ») ou surexpression génique, ont montré de multiples contradictions [47] et de ce fait ne sont pas concluantes.

Ainsi, plus de cinquante ans après la proposition de Harman, la validité de sa théorie reste à confirmer. Toutefois, la théorie des dommages oxydatifs demeure très attractive, non seulement du fait qu'elle est confortée par de multiples résultats, et notamment par la découverte de l'implication de la mitochondrie dans des maladies liées à l'âge, mais aussi parce qu'elle suggère une « thérapie » rationnelle : l'administration d'anti-oxydants qui pourraient retarder l'apparition des dommages liés à l'âge [23].

I. 2. 4. La théorie de l'instabilité génomique ou « the genome maintenance hypothesis of aging ».

En raison de son rôle central dans les phénomènes vitaux, l'ADN a rapidement été impliqué dans le processus de vieillissement. Une hypothèse proposée tout d'abord par Leo Szilard [54] postule que les différentes altérations affectant l'ADN, ainsi que l'accumulation de mutations somatiques, sont à l'origine du vieillissement [55]. Bien que les organismes possèdent des systèmes de réparation de l'ADN chargés d'éliminer ces altérations, l'apparition de défauts affectant ces systèmes semblent être directement liés au vieillissement. En effet, il a été montré que l'efficacité de la machinerie de réparation de l'ADN décline avec l'âge, entraînant une accumulation des dommages. De plus, les syndromes progéroïdes les plus impressionnants tels que le syndrome de Werner, de Hutchinson-Gilford et de Cockayne semblent causés par le dysfonctionnement de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN [56-60]. De nombreux syndromes progéroïdes murins impliquent également la machinerie de réparation de l'ADN [61].

Par ailleurs, il semble bien établi que la fréquence d'apparition des mutations de l'ADN et des aberrations chromosomiques augmente avec l'âge chez la souris [62] et chez l'Homme [63], ce phénomène étant lié à l'apparition de cancers. Toutefois, il est impossible de dire si les modifications de l'ADN répertoriées constituent des effets ou des causes du processus de sénescence. L'étude du rôle des altérations/réparations de l'ADN reste donc un domaine de recherche primordial dans la compréhension du vieillissement.

I. 2. 5. La théorie du raccourcissement des télomères ou « the replicative senescence hypothesis of aging ».

Il y a plus de quarante ans, les docteurs Hayflick et Moorhead, ont mis en évidence la capacité limitée de certaines cellules humaines à se diviser en culture. Ils ont montré que des cellules humaines normales issues de tissus embryonnaires ou de nouveaux-nés, pouvaient réaliser, au maximum, quarante à soixante divisions cellulaires, fourchette souvent mentionnée comme « la limite de Hayflick » [64]. De nombreux scientifiques pensent qu'une longueur critique des télomères détermine cette limite pour la division des cellules humaines [65]. Les télomères sont des séquences d'ADN répétés, positionnés à l'extrémité des chromosomes afin d'en assurer la protection. De nombreuses études s'intéressent au rôle de la déplétion progressive de ces régions dans le processus de vieillissement [66] et un

raccourcissement des télomères a bel et bien été observé dans des cellules en culture au cours du temps [67]. Le même constat a été fait dans certaines cellules sanguines de patients âgés et ce résultat a été corrélé avec l'espérance de vie des sujets [68]. La présence de séquences télomériques chez tous les êtres vivants [69] rend la théorie du raccourcissement des télomères très attractive car elle fournirait une explication universelle au processus de vieillissement. Cependant, certaines données vont à l'encontre de cette idée. Tout d'abord, chez l'Homme, tous les tissus ne se renouvellent pas [70]. D'autre part, le raccourcissement des télomères n'est pas observé chez toutes les espèces : la télomérase, l'enzyme chargée du rallongement des télomères pour le maintien de l'intégrité des chromosomes, est absente des cellules somatiques humaines normales, et n'est active que dans des cellules immortalisées et donc cancéreuses. En revanche, chez la souris, la télomérase fonctionne de façon constitutive [71]. Par conséquent, le raccourcissement des télomères ne semble pas gouverner le vieillissement humain, mais son implication dans le phénomène de sénescence cellulaire demeure d'un intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le vieillissement.

I. 2. 6. La théorie du système neuroendocrinien ou « the neuroendocrine hypothesis of aging ».

Le système neuroendocrinien est un vaste réseau de connections complexes entre le système nerveux central et périphérique et les glandes endocrines. L'hypothalamus gouverne la diffusion des différentes hormones par les différentes glandes endocrines à travers le corps. Avec l'âge, ce système fonctionne moins bien, la sécrétion de plusieurs hormones est altérée et leur efficacité est amoindrie, ce qui peut mener entre autres à une dérégulation de la pression sanguine et du métabolisme glucidique. Ces observations ont conduit à l'établissement d'une théorie du vieillissement impliquant le système neuroendocrinien et plus particulièrement la voie de l'insuline/IGF-1 [72]. Elle s'appuie sur les études réalisées chez *D. melanogaster*, *C. elegans* ainsi que chez la souris qui montrent que des mutations altérant un seul gène de cette cascade peut augmenter la longévité des animaux et leur résistance au stress [19]. L'importante conservation de cette voie de signalisation jusqu'à l'Homme, laisse entrevoir des possibilités d'intervention ciblées visant à prolonger la vie et retarder la sénescence.

Les différentes théories du vieillissement tentent de répondre aux questions « pourquoi et comment vieillit-on ? » mais il s'avère qu'aucune n'est capable d'expliquer à elle seule le phénomène de sénescence. Il semble plus vraisemblable qu'elles proposent des éléments de réponse qui ne doivent ni être mis en opposition, ni considérés comme exclusifs, puisque il est possible qu'ils décrivent plusieurs aspects d'un même phénomène. Chacune d'elles constitue un fil conducteur potentiel, nécessaire dans la démarche de toute étude sur le vieillissement et permet la découverte d'un nombre toujours croissant de gènes impliqués dans la régulation de la longévité.

II. *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude du vieillissement. Voies de signalisation impliquées dans la longévité de *C. elegans*.

Depuis les trente dernières années, les études sur des organismes modèles invertébrés se sont multipliées et représentent désormais un atout majeur dans la recherche sur le vieillissement [73]. Parmi les organismes les plus communément utilisés, on trouve *C. elegans* [11, 74]. Un des principaux intérêts de l'utilisation de ce modèle, outre sa durée de vie courte et sa maniabilité, est l'existence et la disponibilité de nombreux outils génétiques de pointe permettant l'identification d'un nombre toujours plus grand de gènes qui modulent la longévité [75]. Ces gènes, en raison de leur implication dans le processus de vieillissement, ont été baptisés gérontogènes [76].

Différentes approches ont été adoptées chez *C. elegans* afin de découvrir les mécanismes régulant la durée de vie de cet organisme : les manipulations environnementales, les criblages de composés augmentant la longévité et les criblages génétiques. La première intervention environnementale a consisté à tester l'effet de la restriction calorique sur la longévité de l'animal [77] ; ont suivi les traitements hormétiques et le criblage de composés capables de rallonger la durée de vie.

Pour ce qui est de l'approche génétique, l'année 2007 a marqué le vingt-cinquième anniversaire de l'utilisation de *C. elegans* dans des études sur le vieillissement [78]. En effet, en 1982, Johnson et Wood croisent des souches sauvages Bergerac et Bristol, s'intéressent à la longévité des descendants sur plusieurs générations et montrent que les variations de la durée de vie des animaux dépendent d'une composante génétique. Ainsi, ils présentent *C. elegans* comme un organisme prometteur pour l'analyse génétique de la sénescence [79].

A partir de cette date, de nombreux cribles génétiques à grande échelle ont été réalisés ; l'utilisation de la mutagenèse induite par l'EMS (ethyl methane sulfonate) [80, 81] et plus récemment la méthode de criblage par ARN interférence (RNAi) [82-84] ont permis l'identification de nombreux gènes dont la diminution d'expression conduit à des phénotypes de longévité accrue. Les mutants « longue vie » ainsi identifiés ont été regroupés sous le terme de mutants « Age ». De multiples études ont ensuite révélé les mécanismes majeurs régulant la durée de vie de *C. elegans* [85] et nombre d'entre elles ont montré une corrélation positive entre gain de longévité et résistance au stress [86-90]. En effet, la plupart, si ce n'est la totalité des mutants « longue vie » de *C. elegans* présentent une résistance accrue à des stress environnementaux aussi variés que le stress oxydant [91], l'hypoxie [92], le stress thermique [93-95], l'irradiation UV [96] et l'exposition aux métaux lourds [97].

Je présenterai succinctement les différents mécanismes régulant la longévité de *C. elegans* en insistant plus particulièrement sur la voie de l'insuline DAF-2/Ins/IGF-1, qui constitue la voie majeure de régulation de la longévité et de la résistance au stress et dont l'effecteur principal est le facteur de transcription DAF-16, orthologue de ceux de la famille Forkhead (FOXO1, FOXO3, FOXO4) chez les mammifères.

II. 1. Régulation de la longévité chez *C. elegans* par des modifications environnementales.

II. 1. 1. Régulation de la longévité de *C. elegans* par restriction diététique.

La plupart des études utilisant des interventions diététiques utilisent le terme de restriction calorique bien que celui-ci soit en réalité mal approprié ; en effet, certaines études appliquent une réduction de la prise alimentaire correspondant probablement à une diminution du nombre de calories, mais ce paramètre n'est que très rarement, voire jamais mesuré. De plus, des études menées chez *D. melanogaster* montrent que la réduction de la valeur énergétique de la nourriture consommée ne contribue pas *per se* à l'extension de longévité observée chez les individus soumis à une restriction calorique, mais que la modulation de la nature de la nourriture (protéines, sucres, lipides) semble constituer l'élément critique du gain de longévité [98]. De plus, il a très récemment été montré que chez *C. elegans* la diminution de la prise alimentaire n'est pas la seule responsable du gain de longévité obtenu grâce à une restriction calorique, mais que la simple perception de la réduction de nourriture par l'animal intervient dans l'extension de sa durée de vie [99]. Par conséquent, j'utiliserai le terme plus adapté, englobant toutes les interventions nutritionnelles réalisées, de restriction diététique désigné DR pour « Dietary Restriction ».

La première étude ayant rapporté l'effet bénéfique de la DR sur la longévité et qui consiste à réduire l'apport alimentaire sans malnutrition, date de plus de soixante-dix ans et a été réalisée sur des rats [77]. Par la suite, il a été montré que, non seulement, cette intervention diététique augmente la durée de vie moyenne et maximale mais qu'elle retarde aussi l'apparition de dysfonctions liées à l'âge de nombre d'organismes modèles testés, *C. elegans* ne faisant pas exception [100, 101].

Différentes méthodes sont utilisées pour induire la DR chez *C. elegans*: une réduction de la concentration bactérienne en culture en milieu liquide [100, 102, 103] ou sur boîtes d'agar [104], l'utilisation d'un milieu synthétique (cultures axéniques) [105], ou encore une totale

absence de nourriture dans le milieu [106, 107]. Des mutations entraînant un défaut de prise alimentaire (ex : gène *eat-2*) [27], une altération du recensement de la disponibilité des nutriments (ex : gène *let-363/Tor*) [108] ou de l'évaluation de l'état énergétique au niveau cellulaire (ex : gène *aak-2*) [109] ou encore affectant le système de transport de peptides ou d'ions (ex : gènes *pep-2* et *nac-2*) [110, 111] miment également une situation de DR.

Si les travaux basés sur l'utilisation de ces différents traitements ont permis de mettre en évidence des voies de signalisation distinctes, et s'accordent à montrer un gain de longévité (bien que d'intensité variable), accompagné d'une résistance accrue à divers stress [27, 110, 112, 113], ils divergent quant à la dépendance des mécanismes mis en jeu vis à vis du facteur de transcription DAF-16 [105, 114]. L'apparente contradiction de ces résultats pourrait être expliquée par le fait que les différentes méthodes de DR mobilisent des voies de signalisation distinctes, réduisent la prise alimentaire avec une intensité différente ou de manière qualitative en altérant différemment les proportions de protéines, hydrates de carbones et lipides, engageant ainsi divers mécanismes de recensement des nutriments.

Chez l'Homme, la restriction diététique est connue pour diminuer l'incidence des maladies liées à l'âge dont l'athérosclérose et le cancer [115, 116]. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les multiples méthodes de DR chez *C. elegans*, ainsi que l'identification des paramètres variant d'un régime à l'autre seront déterminantes pour l'élaboration d'interventions nutritionnelles capables d'améliorer la qualité et d'accroître la longévité humaine.

II. 1. 1. 1. Implication du gène *sir-2.1* dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.

Le gène *sir2* (« pour silent *information regulator 2* ») a été le premier gène identifié dans la régulation de la DR chez la levure [117]. Il code pour une déacétylase dont l'activité est dépendante du NAD et permet le « silencing » de gènes chez *S. cerevisiae* [118]. Cette protéine mesure le niveau métabolique des cellules et régule leur longévité en fonction de ce paramètre [119]. Chez *C. elegans*, *sir-2.1* semble jouer un rôle dans la régulation de la longévité à la fois en conditions normales et en conditions de DR.

Quand les animaux sont nourris *ad libitum*, une surexpression de *sir-2.1* permet d'augmenter leur durée de vie et de promouvoir l'entrée en dauer (stade larvaire alternatif très résistant dans lequel se réfugient les vers pour faire face à des conditions environnementales défavorables à leur développement et à leur reproduction) par une régulation négative du

récepteur à l'insuline DAF-2 [120]. Certains travaux postulent que les effets observés peuvent être effectivement attribués à une fonction de SIR-2.1 en amont de DAF-2 ou bien à son implication dans une voie parallèle à DAF-2/Ins/IGF-1 mais qui convergerait finalement sur DAF-16 [121]. SIR-2.1 intervient également dans une voie régulant positivement la longévité des animaux et mettant en jeu le Resvératrol, connu pour ses propriétés anti-oxydantes, et les gènes de la famille *abu/pqn*, impliqués dans la réponse à un stress déclenché par le réticulum endoplasmique lors d'une présence massive de protéines mal repliées [122]. L'anti-oxydant lèverait la répression exercée par SIR-2.1 sur ces gènes et permettrait l'augmentation de la longévité ; cette régulation se ferait indépendamment de DAF-16 [123]. Par contre, une interaction SIR-2.1-DAF-16 est requise pour la longévité des animaux en conditions de stress thermique ou oxydant [89].

En conditions de DR, il semblerait que *sir-2.1* influence *eat-2* pour augmenter la durée de vie des animaux ; dans ce cas, SIR-2.1 agirait de façon indépendante de DAF-16 [121]. Des analyses génétiques et de profils d'expression de ces deux gènes ont permis d'éclairer leur relation et leurs différentes contributions à la régulation de la longévité de *C. elegans* dans des conditions normales ou de DR: SIR-2.1 et DAF-16 présentent des localisations et des fonctions communes mais également distinctes [121].

II. 1. 1. 2. Implication de la voie LET-363/TOR dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.

TOR (« Target Of Rapamycin ») est une kinase très conservée positionnée à l'intersection de différentes cascades signalétiques et qui contrôle la croissance cellulaire en fonction de la disponibilité des nutriments [124]. Chez *C. elegans*, LET-363, l'orthologue de TOR, couplé à DAF-15, l'orthologue de RAPTOR (« regulatory associated protein of TOR »), constitue également un point de contrôle de la disponibilité des nutriments et régule la traduction, la dégradation protéique [125], le développement larvaire, le métabolisme et la longévité [126] en fonction de ce paramètre. Une DR augmente la durée de vie de *C. elegans* essentiellement en diminuant l'activité de voies de signalisation impliquées dans la croissance et le recensement des nutriments, telles que la voie LET-363. Une diminution de l'expression de *let-363*, entraîne une remarquable extension de la durée de vie moyenne des animaux (environ 150%) [108], qu'une DR ne peut accroître davantage [127]. Ces données suggèrent qu'une inhibition de la voie de LET-363 joue un rôle important dans la longévité en réponse à une limitation de l'apport alimentaire.

De plus, une mutation de *daf-15*, entraîne également un gain de longévité de 30% [126] et il a été montré que PEP-2, un transporteur de peptides au niveau intestinal, dont la diminution d'expression mime également une DR, agit en amont de LET-363 dans une même voie de régulation [110].

Il existe des preuves expérimentales d'une interaction entre la voie DAF-2/Ins/IGF-1 et la voie LET-363 en conditions normales. Il a été montré que *daf-15* est sous le contrôle transcriptionnel de DAF-16 [126], ce qui permet la régulation de l'activité métabolique, le renouvellement des protéines et la mobilisation des défenses contre le stress ; or, tous ces paramètres sont profondément modifiés par une DR. Il est donc tentant de spéculer que DAF-16 influence le complexe LET-363/DAF-15 en conditions de DR. Cependant, Henderson *et al.* ont montré que l'extension de longévité obtenue par une diminution de l'expression de *let-363*, se fait indépendamment de DAF-16 [128]. Ces résultats suggèrent que l'ensemble de ces mécanismes est soumis à une régulation complexe et modulable en fonction des conditions environnementales.

II. 1. 1. 3. Implication de l'AMPK dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.

L'AMP-activated kinase (AMPK) est, comme son nom l'indique, une kinase sensible à l'Adénosine Mono-Phosphate ; elle est donc activée par une baisse du niveau d'énergie de la cellule, qu'elle évalue par la mesure du ratio AMP/ATP, or, la DR entraîne une diminution de ce ratio. Il n'a donc pas été très surprenant de trouver cette kinase, et plus précisément une de ses deux sous-unités catalytiques, AAK-2, impliquée dans le mécanisme d'extension de la durée de vie de *C. elegans* dans des conditions de DR [109]. Certains travaux rapportent que le rôle de AAK-2 dans la longévité est indépendant de l'activité de DAF-16, mais cependant partiellement régulé par la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [109, 129] alors que d'autres montrent que l'AMPK, non seulement augmente la longévité de ces animaux mais améliore aussi leur résistance au stress par un mécanisme au moins en partie dépendant de DAF-16 [104]. En effet, AAK-2 activerait directement DAF-16, sur des sites jusque là inconnus, et permettrait ainsi l'activation transcriptionnelle du gène de la superoxyde dismutase 3 (*sod-3*). Il a récemment été montré que l'AMPK phosphoryle le facteur de transcription humain FOXO3 *in vitro* et *in cellulo*, ce qui conforte les résultats rapportés chez *C. elegans* et suggère une conservation de ce nouveau mécanisme au cours de l'évolution [130].

Par ailleurs, l'AMPK est connue pour réguler la voie TOR chez les mammifères [131] ; or, chez *C. elegans*, d'une part LET-363 est impliquée dans le gain de longévité conféré par une DR (voir paragraphe II. 1. 1. 2.) et d'autre part, la durée de vie du nématode est augmentée lorsque le gène *rsk-1*, orthologue de la kinase ribosomale S6 et cible de LET-363, est muté (voir paragraphe II. 3. 4. et [132]). Par conséquent, en conditions de DR, la voie LET-363-RSKS-1 pourrait en partie transduire le signal émis par AAK-2, contribuant ainsi à une augmentation de la longévité des vers.

Il serait intéressant de tester si AMPK est également capable de réguler les autres protéines impliquées dans la réponse à une DR, à savoir, SIR-2.1, PHA-4 et SKN-1 (voir paragraphes II.1. 1. 1. et II. 1. 1. 5.).

En outre, AAK-2 semble servir de relais à plusieurs voies de signalisation régulant la longévité. En effet, une étude a mis en évidence que l'activité de AAK-2 participe au phénotype « longue vie » des mutants *daf-2* hypomorphes, des animaux surexprimant *sir-2.1* et des mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale. De par sa position au sein d'un réseau de voies de signalisation capable d'intégrer différents paramètres physiologiques et environnementaux, AAK-2 joue certainement un rôle crucial dans le contrôle de la longévité de *C. elegans* [129] (**Figure 2**).

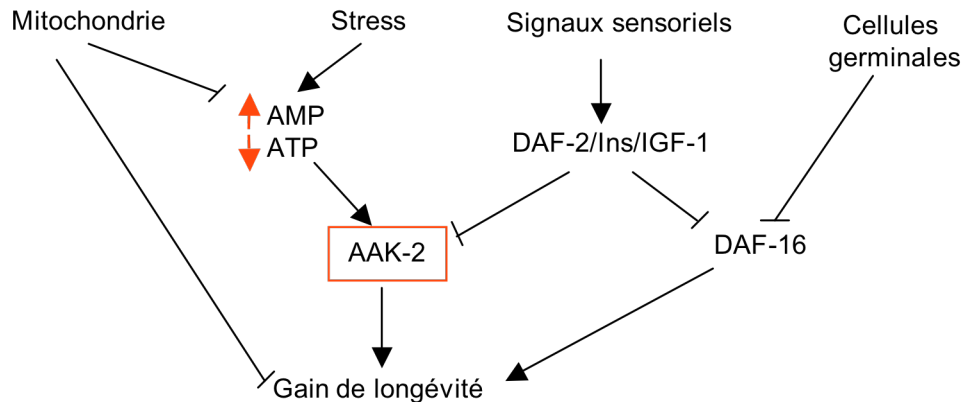


Figure 2: Modèle pour la fonction de AAK-2 dans la régulation de la longévité.

Ce modèle résume le réseau formé par diverses voies de signalisation dans lequel s'intègre AAK-2 pour contrôler la longévité. Bien que DAF-16 soit absolument nécessaire au gain de longévité des mutants *daf-2* hypomorphes, AAK-2 contribue aussi à leur phénotype. D'autre part, la voie impliquant la mitochondrie et la variation du ratio AMP/ATP ne requiert que AAK-2. AAK-2 et DAF-16 répondent à des signaux se recoupant mais pouvant être distincts et fonctionnent donc en parallèle pour intégrer plusieurs signaux et réguler la longévité. Il est possible que AAK-2 régule l'activité de cibles de DAF-16, voire DAF-16 lui-même. (D'après [129]).

II. 1. 1. 4. Implication de l'autophagie dans la régulation de la longévité dans des conditions de DR.

L'autophagie est un processus catabolique très conservé permettant la dégradation de protéines à demi-vie longue et d'organites de cellules eucaryotes suite à un stress environnemental (manque de nourriture, hypoxie, choc thermique) ou un stress cellulaire (présence de mitochondries endommagées, de peroxisomes surnuméraires, d'agrégats protéiques ou de pathogènes). Ce phénomène consiste en la formation de vésicules appelées autophagosomes qui récupèrent des composants cytoplasmiques et qui, après fusion avec des lysosomes, dégradent le matériel séquestré [133].

L'autophagie se présente comme une réponse de survie (au niveau cellulaire ou d'un organisme entier) face à un apport en nutriments limité, car elle permet de générer la source de substrats métaboliques nécessaire au maintien de l'activité cellulaire basale [134]. Ce mécanisme a été très étudié chez nombre d'organismes dont *C. elegans*, chez lequel il est requis pour une survie optimale des animaux sauvages pendant une période de jeûne [135]. Par ailleurs, ce mécanisme constitue un processus cellulaire essentiel pour la formation des larves dauer (ce qui est cohérent puisque l'entrée dans ce stade larvaire se fait en réponse à des conditions de stress et notamment à une raréfaction de la nourriture) et pour l'extension de la durée de vie des animaux via la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [136].

C. elegans possède plusieurs gènes orthologues de ceux impliqués dans l'autophagie chez la levure (gènes APG) ; le gène *bec-1* code pour une protéine de 375 acides aminés qui partage 28% d'homologie avec la protéine APG6/VPS30 de levure et 31% avec son orthologue de mammifère, la bécline. *bec-1* n'est pas requis pour l'entrée en dauer mais est nécessaire pour la morphogénèse de ces larves dans un contexte génétique *daf-2* mutant ainsi que pour leur survie à 25°C. De plus, l'expression de *bec-1* est nécessaire à l'extension de longévité des mutants *daf-2* adultes. D'autres résultats ont conduit à la conclusion que la voie DAF-2/Ins/IGF-1 régule négativement l'autophagie chez *C. elegans*, non seulement par son action sur l'expression de *bec-1* mais aussi sur deux autres gènes impliqués dans le processus d'autophagie, *atg-7* (une protéine « E1-ubiquitine-like », orthologue de ATG7 chez la levure) et *atg-12* (une protéine « ubiquitine-like », orthologue de ATG12 chez la levure) [137].

Plusieurs études récentes rapportent un phénomène d'autophagie accru en réponse à une DR. Une augmentation des autophagosomes, visualisée par l'utilisation d'un transgène exprimant la protéine LGG-1, spécifique de ces vésicules, étiquetée avec une GFP, a été rapportée chez plusieurs mutants présentant des défauts de prise alimentaire [138].

Il a également été montré que *bec-1* et *atg-7* sont requis dans l'extension de longévité des mutants *eat-2* (vers présentant une dysfonction du pharynx qui les empêchent de se nourrir correctement et les soumet donc à une DR) [139]. Ces résultats suggèrent que l'autophagie pourrait médier les effets de la DR chez *C. elegans*.

De plus, d'autres travaux montrent que, de la même façon que TOR chez la levure et les mammifères [140], LET-363 inhibe l'autophagie chez *C. elegans* [141]. Or l'expression de la voie LET-363 étant diminuée lors d'une DR, une stimulation du phénomène d'autophagie a donc été observée chez des animaux soumis à une limitation de nourriture. Ces travaux rapportent que, le facteur de transcription PHA-4, orthologue de FoxA (HNF-3) chez les mammifères, participerait à cette stimulation. L'augmentation de l'autophagie suite à une DR n'est donc pas une conséquence passive d'une limitation de nourriture, mais nécessite vraisemblablement des changements d'expression génique. Il serait intéressant de déterminer quels gènes sont induits par PHA-4 pour réguler l'autophagie.

L'autophagie s'intègre dans le large réseau de voies de signalisation régulant la longévité. Un modèle récent propose la convergence de ces différents mécanismes vers les gènes régulant l'autophagie (**Figure 3**).

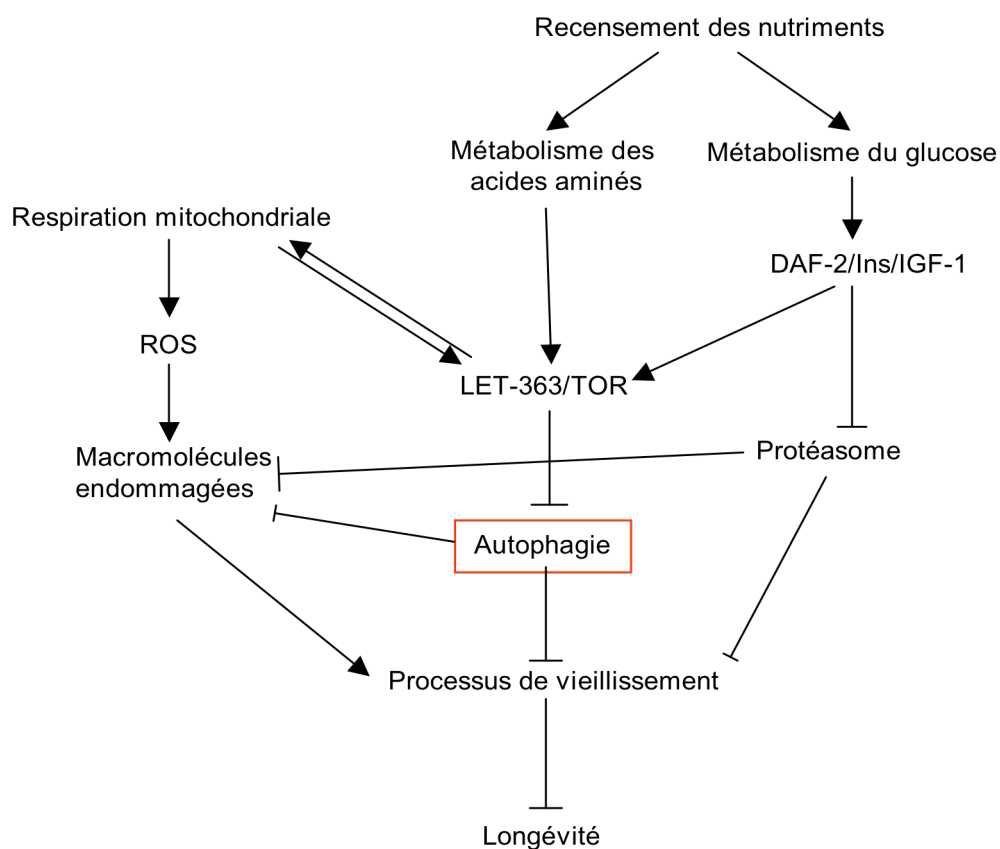


Figure 3: modèle pour la régulation de la longévité de *C. elegans* par l'autophagie. Les voies DAF-2/Ins/IGF-1, LET-363/TOR et la voie des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale impliquées dans la longévité convergent vers les gènes contrôlant l'autophagie pour réguler la durée de vie de l'animal. En aval de DAF-2/Ins/IGF-1, l'autophagie agirait en parallèle du système

protéasomal pour contrôler le vieillissement. Les flèches indiquent des activations, les bâtonnets indiquent des inhibitions. (D'après [142]).

II. 1. 1. 5. Implication des facteurs de transcription PHA-4 et SKN-1 dans la régulation de la longévité en conditions de DR.

La réponse à une DR n'est pas un processus passif et requiert des changements dans l'expression de certains gènes ; différentes études ont pu ainsi mettre en évidence l'implication d'au moins deux facteurs de transcription dans l'extension de longévité observée dans des conditions de DR.

II. 1. 1. 5. a) PHA-4.

Le groupe d'Andrew Dillin a montré que PHA-4, facteur de transcription orthologue de la protéine mammifère FoxA (HNF-3), connu pour jouer un rôle déterminant dans le développement du ver [143] possédait également une fonction essentielle dans l'extension de la longévité en conditions de DR [102] ; en effet, il régule la production de glucagon et l'homéostasie du glucose chez l'adulte, particulièrement en réponse à un jeûne. Ainsi, PHA-4 est requis pour la transmission du signal de DR. De plus, il a récemment été montré que, dans ces conditions, l'activité transcriptionnelle de PHA-4 est notamment requise pour stimuler l'autophagie liée à la DR ; or LET-363 régule cette autophagie [141], il se pourrait donc que LET-363 et PHA-4 agissent de manière synergique pour réguler le processus d'autophagie induit par une DR.

Par ailleurs, la fonction de PHA-4 dans la régulation de la longévité des animaux est spécifique aux conditions de DR, puisque PHA-4 ne contribue pas au gain de longévité des mutants des autres voies de signalisation connues pour réguler le vieillissement [78].

II. 1. 1. 5. b) SKN-1.

Ce facteur de transcription est l'orthologue de la protéine Nrf2 chez les mammifères [144], membre de la famille des protéines cnc (« cap-n-collar »), qui induisent l'expression de gènes codant pour des enzymes détoxifiantes en réponse à un stress oxydant. Chez *C. elegans*, SKN-1 initie le développement des structures permettant l'alimentation (pharynx) et la

digestion (intestin) pendant les stades embryonnaires précoces [145, 146]. Il a été montré que l'expression intestinale de SKN-1 orchestre la réponse immunitaire innée par l'activation de gènes codant pour des enzymes de détoxification et de réponse au stress oxydant (glutathione S-transférase, NADPH-quinone oxydoréductase, superoxyde dismutase) [147] et participe également à la régulation de la longévité [148] (voir paragraphe II. 3. 5. 3. f)). En revanche, son expression constitutive dans les neurones ASI (neurones sensoriels) est requise pour l'extension de longévité conférée par une DR, désignant ainsi *skn-1* comme un régulateur essentiel (bien que non spécifique) de cette réponse [103]. En effet, en réponse à la DR, SKN-1 est activé spécifiquement dans les neurones ASI qui génèrent alors un signal hormonal ; celui-ci active à son tour l'activité métabolique des tissus périphériques, ce qui entraîne une augmentation de la respiration mitochondriale et de la longévité. Bien qu'essentielle, l'expression de *skn-1* dans les neurones ASI ne suffit pourtant pas à promouvoir la réponse à la DR, impliquant la participation synergique d'autres voies de signalisation.

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer les effets bénéfiques de la DR sur la longévité [149]. Chez *C. elegans*, les relations entre les différents mécanismes mis en évidence, sont complexes et certaines demeurent à caractériser (**Figure 4**).

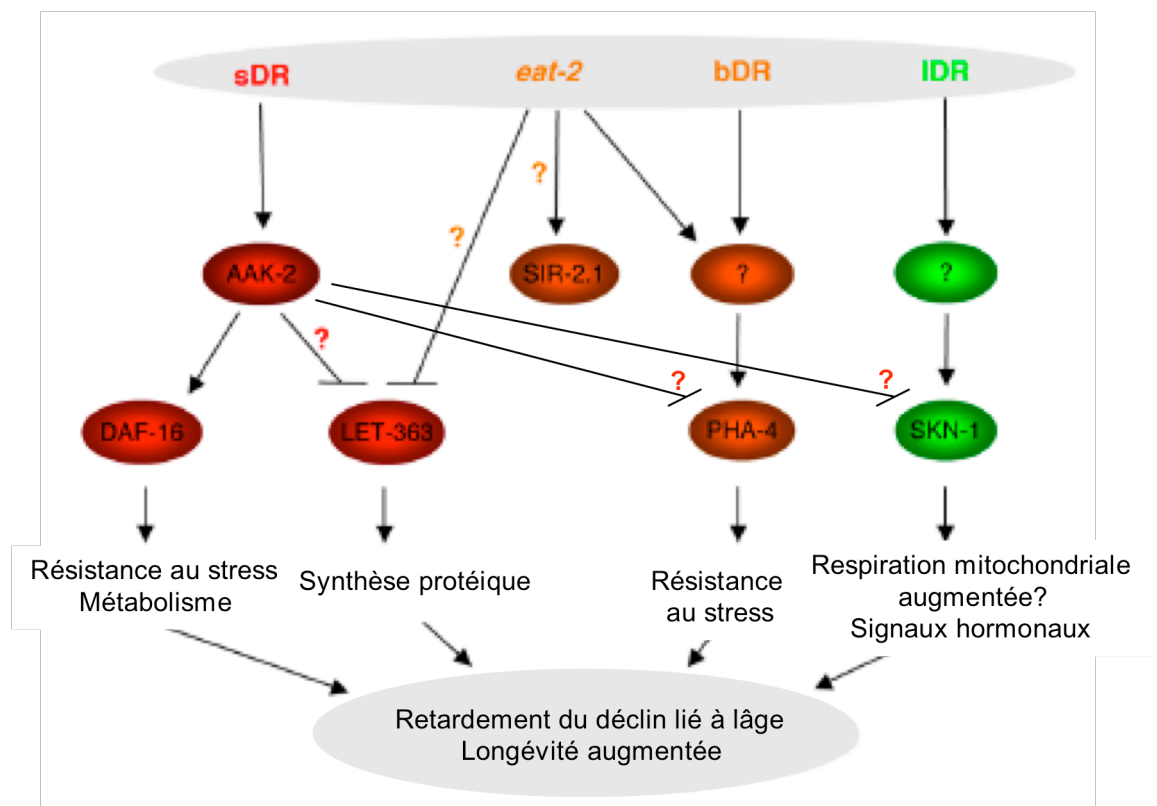


Figure 4: modèle récapitulant les différents acteurs de la réponse à la restriction diététique. Les diverses méthodes mises en jeu pour induire une restriction diététique permettent d'activer des voies de signalisation distinctes ou de les affecter à des degrés différents. Les points d'interrogations oranges indiquent des données contradictoires rencontrées dans la littérature [121, 127, 128], les

points d'interrogations rouges indiquent des interactions non confirmées chez *C. elegans*. (**sDR**: milieu solide [104] ; **bDR**: milieu liquide [100, 102] ; **IDR**: milieu liquide [103] ; **DD**: absence de nourriture [106, 107] ; **Milieu axénique** [150]). (D'après [104]).

De plus, de nouveaux liens avec des voies connues pour réguler la longévité ont été mis en évidence, ce qui complique l'établissement d'un modèle. Par exemple, il est connu que DAF-16 est requis pour l'extension de longévité des animaux dépourvus de cellules germinales [151] (voir paragraphe II. 3. 1.) ; pourtant, il a été montré qu'une DR détermine la façon dont des mutants de délétion de *daf-16* répondent à un retrait des cellules germinales. Par conséquent, ces résultats indiquent que l'ablation des cellules de la lignée germinale est capable d'affecter la longévité indépendamment de DAF-16, spécifiquement dans des conditions de DR [152].

II. 1. 2. Régulation de la longévité par exposition à un stress modéré ou hormésis.

L'hormésis, dont le principe peut se résumer par la célèbre maxime du philosophe Nietzsche : « Ce qui ne nous tue pas, nous rend plus forts », a été décrite pour la première fois en 1888 par le pharmacologiste allemand Hugo Schulz qui a observé la stimulation de la croissance de *S. cerevisiae* par de faibles doses de poison [153]. L'intérêt des biogérontologistes pour l'hormésis en tant qu'intervention visant à ralentir le vieillissement ou à augmenter la longévité s'est développé beaucoup plus tard [154-156]. Des travaux sur *S. cerevisiae* [157], sur *D. melanogaster* [158-161] et sur les rongeurs [162-164] ont montré les effets bénéfiques de divers stress (hypergravité, choc thermique, stress oxydant, radiations...) sur la longévité et la résistance au stress des animaux.

Différents traitements hormétiques se sont également montrés capables d'augmenter la résistance à divers stress ainsi que la longévité de *C. elegans* [165]. Le premier rapporté a été le choc thermique [94, 166]: des animaux soumis à des stress thermiques sub-létaux présentent une longévité et une tolérance thermique augmentées [165]. Une induction de l'expression du gène *hsp-16*, codant pour une protéine de choc thermique, serait responsable de ces effets bénéfiques [167, 168].

D'autres types de stress hormétiques, tels que des conditions d'hyperoxie [166] ou une exposition à la juglone (agent oxydant), augmentent également la durée de vie et la résistance au stress des animaux [169], probablement grâce à l'induction d'enzymes anti-oxydantes, bien que cela reste à démontrer.

Il faut noter qu'une augmentation de l'expression de protéines HSP et d'enzymes anti-oxydantes est rapportée chez les mutants « longue vie » de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [170]. Il est donc tentant de suggérer une implication de l'hormésis dans l'extension de la longévité et la résistance accrue à divers stress de ces mutants, d'autant plus que l'augmentation de la durée de vie des vers suite à un traitement hormétique thermique ou oxydant est supprimée par une mutation du gène *daf-16* [165, 171]. Il paraît donc possible qu'une diminution de la signalisation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 cause un stress relevant de l'hormésis. Néanmoins, d'autres expériences sont nécessaires pour déterminer si tel est réellement le cas.

La DR peut également être considérée comme un traitement hormétique puisqu'elle entraîne l'expression de facteurs de réponse au stress tels que les protéines HSP, la superoxyde dismutase ou la catalase [172] et que, de plus, elle entraîne une augmentation de la longévité de plusieurs espèces. Un lien a récemment été établi entre la restriction en glucose et l'hormésis à travers une augmentation de la respiration mitochondriale et du stress oxydant [173]; de ce point de vue, la DR constitue donc un stress modéré et les animaux qui y sont soumis réagissent à ce stress en activant leurs systèmes de défense qui les protègent également contre le vieillissement.

Une caractérisation plus précise des phénotypes observés en réponse à des traitements hormétiques au niveau moléculaire et physiologique devrait contribuer à une meilleure compréhension du phénomène de vieillissement et conduire à long terme à proposer des interventions capables de retarder la sénescence chez l'Homme.

II. 2. Régulation de la longévité de *C. elegans* par des traitements pharmacologiques.

De nombreux composés pharmacologiques et naturels ont montré des effets bénéfiques sur la longévité de *C. elegans* [174]. Parmi eux, des molécules anti-oxydantes utilisées dans le but de tester la validité de la théorie oxydative du vieillissement, des extraits naturels de plantes et des composés identifiés lors de cribles d'agents influençant la longévité de *C. elegans*. Une brève description de ces composés est présentée dans les paragraphes suivants.

II. 2. 1. Effets de molécules anti-oxydantes sur la longévité de *C. elegans*

Se basant sur la théorie oxydative du vieillissement, selon laquelle les ROS sont responsables du vieillissement, plusieurs composés anti-oxydants, capables de réduire leur

action délétère, ont donc été utilisés afin de tester s'ils pouvaient retarder le vieillissement et augmenter la durée de vie.

II. 2. 1. 1. Effet de l'administration de la vitamine E, de ses dérivés et de l'Ubiquinone.

La vitamine E (α -tocophérol), les tocotriénols (dérivés de la vitamine E), et le coenzyme Q (Ubiquinone), composés anti-oxydants présents de façon endogène chez *C. elegans*, sont capables d'augmenter la longévité de l'animal d'environ 20% quand ils sont administrés en complément de son alimentation [175, 176]. Les mécanismes d'action de la vitamine E et de ses dérivés dans cette extension de l'espérance de vie du nématode, bien qu'ils ne soient pas caractérisés, sont attribués respectivement à un ralentissement du développement et à une réduction des dommages oxydatifs, données qui alimentent la théorie oxydative du vieillissement.

Pour ce qui est de la supplémentation en Ubiquinone, son effet positif sur la longévité serait dû à une réduction du stress oxydant au niveau de la mitochondrie [177]. Cependant, certaines études rapportent au contraire qu'une déficience en Ubiquinone dans l'alimentation des vers [178], ou une incapacité à le synthétiser, comme c'est le cas chez les mutants *clk-1* (*clk-1* code pour une enzyme participant à la synthèse de l'Ubiquinone), engendre un gain de longévité [28, 29, 179]. Ces résultats contradictoires suggèrent que le métabolisme mitochondrial peut être perturbé par des doses extrêmes de coenzyme Q.

II. 2. 1. 2. Effet de l'administration de Resvératrol

L'effet bénéfique d'un autre composé connu pour ses propriétés anti-oxydantes, le Resvératrol, a également été mis en évidence ; il s'agit d'un composé polyphénolique (3, 4', 5-trihydrostilbène) présent dans plusieurs végétaux et notamment dans le raisin. Un crible, réalisé dans le but de trouver des activateurs de la déacétylase SIR-2.1, dont la surexpression prolonge la durée vie de plusieurs organismes modèles tel que *C. elegans* [180], a identifié le Resvératrol comme un activateur de SIR-2.1 [181]. Une extension de la durée de vie moyenne de *C. elegans* a été observée suite à l'administration de ce composé [122, 182]. Après avoir tout d'abord suggéré que le Resvératrol activait SIR-2.1, il semblerait plutôt que ce composé lève l'inhibition qu'impose la déacétylase sur la famille de gènes de réponse au stress, les gènes *abu/pqn*, et permette ainsi un gain de longévité [123] (**Figure 5**).

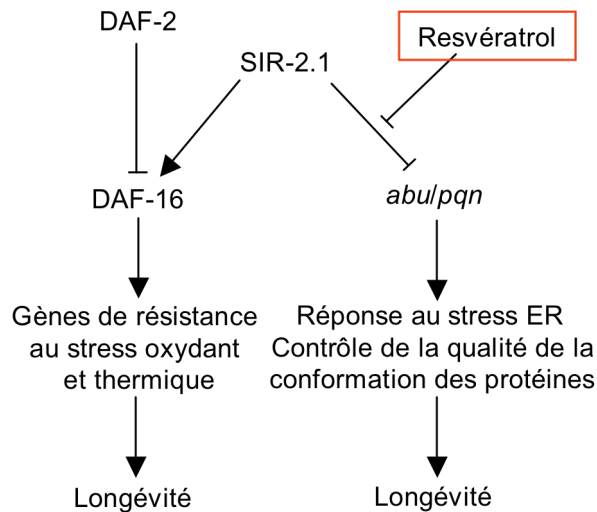


Figure 5: le Resvératrol augmente la durée de vie de *C. elegans* en induisant l'expression des gènes de réponse au stress ER.

SIR-2.1 est impliqué dans au moins deux voies de signalisation différentes régulant la longévité du ver. D'une part, SIR-2.1 agit via DAF-16 qui active la transcription de ses gènes cibles, impliqués dans la résistance au stress oxydant (gènes codant pour la superoxyde dismutase, les catalases...) et thermique (gènes codant pour les protéines de choc thermique). D'autre part, SIR-2.1 réprime l'expression des gènes de la famille *abu/pqn*, qui sont impliqués dans le contrôle de la qualité de repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique (ER). Le Resvératrol inhibe l'action de SIR-2.1, ce qui conduit à une dérégulation des gènes *abu/pqn*. L'augmentation de leur expression permet une meilleure surveillance de la conformation des protéines dans le ER, ce qui *in fine* mène à une extension de la durée de vie de l'animal. (D'après [122]).

Cependant, ces résultats sont désormais controversés. Alors que des effets similaires avaient été rapportés chez *D. melanogaster* [183], une nouvelle étude rapporte que le Resvératrol n'entraîne aucune extension de la longévité de cet organisme ; la même étude, conduite en parallèle sur *C. elegans*, montre non seulement des résultats variables, mais suggère aussi que l'anti-oxydant agirait de façon indépendante de SIR-2.1 [184]. En effet, les auteurs proposent son implication dans un tout autre mécanisme : selon le même mode d'action que chez les mammifères [185], il est possible que le Resvératrol active l'AMP kinase (senseur central des réserves énergétiques de la cellule) au niveau des neurones, produisant ainsi un effet neuroprotecteur responsable du gain de longévité chez *C. elegans*, toutefois aucune expérience n'a encore été conduite dans cette direction. Au vu des différents travaux pour le moins contradictoires, la contribution du Resvératrol à un effet bénéfique sur le vieillissement reste encore à confirmer.

II. 2. 1. 3. Effet de l'administration de mimétiques d'enzymes anti-oxydantes.

Outre l'impact de composés non enzymatiques sur la longévité de *C. elegans*, l'effet de mimétiques d'enzymes anti-oxydantes a également été étudié. Eukarion-8 et Eukarion-134 (EUK-8 et EUK-134) sont des composés qui présentent des activités enzymatiques comparables à celles de la superoxyde dismutase et de la catalase [186] et permettent une extension de longévité chez des souris déficientes en superoxyde dismutase [187]. Chez *C. elegans*, l'administration de ces mimétiques a entraîné des effets controversés : alors qu'une augmentation d'environ 40% de la longévité a été rapportée par certaines études [188, 189], d'autres n'ont montré aucune variation, voire même un effet opposé sur la longévité [190] bien que l'activité superoxyde dismutase de ces drogues ait bel et bien été observée et prévienne une réduction de la survie d'animaux soumis à des oxydants [191].

Les études pharmacologiques menées chez *C. elegans* afin de tester la théorie oxydative du vieillissement ont donné des résultats en faveur de cette hypothèse, bien que certaines données s'affrontent, mais le point critique demeure la détermination du mécanisme d'action de ces composés.

II. 2. 2. Effet de l'administration d'extraits de plantes contenant un mélange de composés chimiques sur la longévité de *C. elegans*.

II. 2. 2. 1. Effet de l'administration d'extrait de myrtilles.

Les extraits de myrtilles ont été rapportés pour avoir des effets bénéfiques sur des rongeurs âgés [192]. Ces extraits contiennent un mélange complexe de polyphénols qui peuvent présenter des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Se basant sur ces données, les effets de ces extraits ont été testés sur *C. elegans*. Ils se sont avérés capables d'augmenter la durée de vie des animaux de près de 30%, d'augmenter la résistance au stress thermique et de retarder certaines manifestations liées à l'âge (accumulation de lipofuscine, ralentissement de l'activité du pharynx, augmentation de l'expression des protéines HSP) [193]. Ces effets ont été attribués aux pro-anthocyanes contenus dans les extraits ; leur mécanisme d'action n'a cependant pas été entièrement élucidé : il impliquerait une voie de réponse au stress osmotique régulé par la protéine OSR-1 (« osmotic stress resistant ») et la p38 MAP kinase [194], requise pour la résistance au stress osmotique, et serait indépendant de la déacétylase SIR-2.1 et des facteurs de transcription DAF-16 et SKN-1.

II. 2. 2. 2. Effet de l'administration d'extrait de feuilles de *Ginkgo biloba*.

L'extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* (EGb761), « l'arbre aux quarante écus », dont l'âge peut atteindre plusieurs siècles, a été largement utilisé dans le traitement du déclin de la fonction mentale accompagnant le vieillissement. Afin de comprendre le mécanisme d'action de ce mélange de flavonoïdes et de terpènes, l'effet de cet extrait a été analysé sur le processus de vieillissement de *C. elegans*. Alors que l'extrait total n'entraîne qu'un gain médiocre de longévité, l'administration du flavonoïde tararixetin, purifié à partir du EGb761, augmente la durée de vie moyenne de 28% et la résistance au stress thermique et oxydant [195]; ce composé stimulerait les protections de l'animal contre le stress, entraînant l'extension de longévité [196].

La difficulté de l'utilisation d'extraits complexes de plantes dans des études sur la longévité consiste à déterminer si l'effet bénéfique est dû à un composé en particulier ou à la synergie d'action de plusieurs des composants du mélange. D'autre part, l'identification du mécanisme d'action d'un extrait total peut être biaisée par l'observation d'effets positifs, complètement indépendants du processus de vieillissement.

II. 2. 3. Effet de l'administration d'anticonvulsifs sur la longévité de *C. elegans*.

Une autre intervention pharmaceutique, l'administration des anticonvulsifs Ethosuccinate, Triméthadione et DEABL (à des doses thérapeutiques humaines), rallonge la durée de vie de *C. elegans* de 17%, 47% et 31% respectivement [197] et retarde le ralentissement des fonctions motrices de l'animal. Ces drogues sont issues d'un crible dont l'objectif était d'identifier parmi les molécules testées des modulateurs bénéfiques de la longévité de *C. elegans*, sans cibler délibérément un mécanisme de régulation connu. De manière cohérente avec leur activité sur le système nerveux des vertébrés, leurs effets chez le ver semblent dus à leurs propriétés anticonvulsives, stimulant la transmission synaptique. Le mécanisme par lequel ils affectent la longévité serait indépendant de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, de la fonction mitochondriale et des mécanismes mis en jeu par la DR [198], mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour définir les cibles directes de ces drogues.

II. 2. 4. Effet de l'administration d'antidépresseurs sur la longévité de *C. elegans*.

Un crible de composés chimiques, destiné à tester leur capacité à augmenter la longévité de vers adultes, a permis d'identifier quatre antagonistes du récepteur à la sérotonine, la miansérine, la mirtazapine, la méthiothépine et la cyproheptadine, qui prolongent la durée de vie de *C. elegans* de 20 à 33% [199]. La miansérine et la mirtazapine sont utilisées chez l'Homme dans le traitement de la dépression, la cyproheptadine dans le traitement de la migraine et des symptômes allergiques tandis que la méthiothépine n'est pas encore utilisée dans les essais cliniques. De la même façon qu'elles inhibent la signalisation de la sérotonine chez l'Homme, la miansérine, la mirtazapine, et la cyproheptadine prolongent la durée de vie de *C. elegans* en bloquant la transduction du signal via les récepteurs à la sérotonine SER-4 et à les récepteurs à l'octopamine (équivalent de la noradrénaline des vertébrés [200]) SER-3. Il a été montré que le mécanisme à l'origine de cette extension de longévité est associé à ceux mis en œuvre lors d'une DR ; cependant, bien que chez *C. elegans*, la sérotonine soit impliquée dans le « pumping » du pharynx [201], ces trois composés chimiques ne diminuent pas la prise alimentaire du ver. C'est par leur action sur les récepteurs SER-3 et SER-4, qui servent également à signaler la présence ou l'absence de nourriture [202, 203], que ces drogues provoquent la perception erronée d'absence de nourriture. Par conséquent, malgré une prise alimentaire normale, elles déclencheraient des mécanismes de longévité sous l'influence de la DR. De manière intéressante, chez l'Homme, l'administration de la miansérine a pour effet secondaire une augmentation de l'appétit [204], ce qui suggère une possible conservation du lien entre appétit et longévité chez *C. elegans* et chez les humains.

II. 3. Régulation génétique de la longévité de *C. elegans* : implications de nombreuses voies de signalisation.

II. 3. 1. Régulation de la longévité par les signaux hormonaux émanant de la gonade.

Des signaux hormonaux émanant de la gonade influencent également la longévité de *C. elegans* [151]. Quand *C. elegans* éclot, sa gonade est formée de quatre cellules précurseurs, Z1, Z2, Z3 et Z4 [205]. Z1 et Z4 donnent naissance à la partie somatique de la gonade (spermathèque et utérus chez les hermaphrodites ; organe reproducteur, vésicules séminales et *vas deferens* chez les mâles, <http://www.wormbook.org>) alors que Z2 et Z3 donnent naissance

aux cellules de la lignée germinale. Il a été montré qu'une ablation ciblée au laser des cellules de la lignée germinale Z2 et Z3 augmente d'environ 60% la longévité de l'animal ; l'ablation de la gonade entière (Z1, Z2, Z3, Z4) n'a pas d'effet sur la longévité des animaux [17], montrant que l'extension de longévité observée précédemment n'est pas causé par la stérilité des animaux. En revanche, une ablation des cellules Z1 et Z4, raccourcit la durée de vie des animaux. Par conséquent, chez les animaux sauvages, d'après le modèle proposé par Hsin et *al.*, deux signaux hormonaux antagonistes émanent de la gonade pour réguler la longévité ; de plus, l'extension de la durée de vie obtenue par l'ablation des cellules germinales requiert la partie somatique de la gonade. Une approche génétique, utilisant des mutants mimant l'ablation de l'un ou l'autre des composants de la gonade [206] a conduit aux mêmes conclusions. Cet effet est dépendent du facteur de transcription DAF-16 et de la voie de signalisation stéroïdienne impliquant le récepteur hormonal nucléaire DAF-12, apparenté au récepteur à la vitamine D chez les mammifères [151] et DAF-9, un orthologue du cytochrome P450, impliqué dans la synthèse du ligand de DAF-12 [207].

Un signal négatif en provenance des cellules germinales est adressé aux cellules intestinales et empêche la localisation nucléaire de DAF-16 et l'extension de la longévité en inhibant KRI-1, une protéine contenant des répétitions ankyrine et un domaine FERM (homologie avec 4.1, ezrin, radixin et moesin [208]. De façon similaire, la voie DAF-12 régule la localisation nucléaire de DAF-16 et la longévité médiée par les cellules germinales. A l'inverse, la partie somatique de la gonade génère un signal positif et augmente la longévité en inhibant l'activité de DAF-2 [209]. DAF-12 exerce également un effet positif sur la longévité indépendamment de DAF-16 (**Figure 6**).

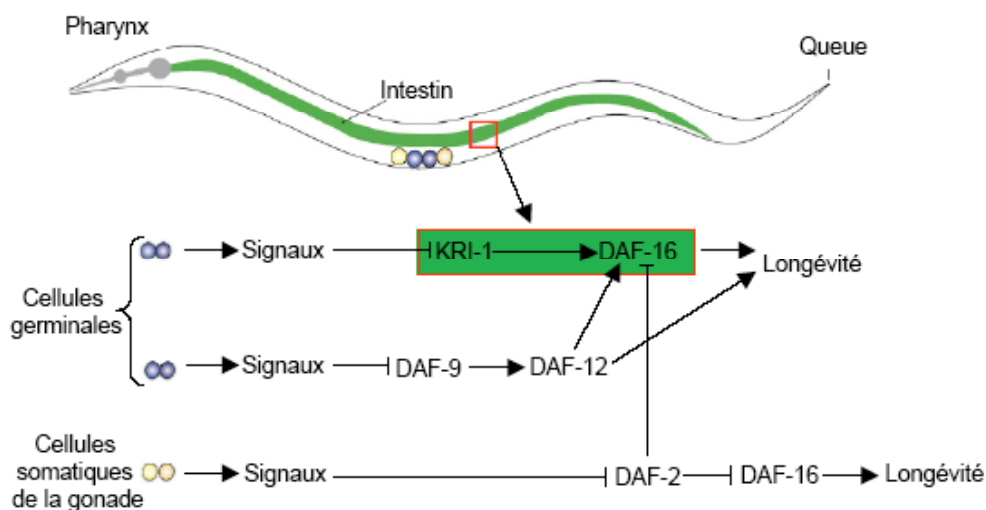


Figure 6: Modèle de régulation de la longévité par le système reproducteur chez *C. elegans*. Les signaux produits par les cellules germinales empêchent la localisation nucléaire de DAF-16 dans les

cellules intestinales (intestin coloré en vert) en inhibant KRI-1 et la voie de signalisation stéroïdienne DAF-9/DAF-12. La partie somatique de la gonade produit des signaux antagonistes qui inhibent le récepteur DAF-2. Elle promeut ainsi la longévité de l'animal en levant l'inhibition de DAF-16. Les flèches indiquent des régulations positives, les bâtonnets indiquent des régulations négatives. (D'après [209]).

Une étude récente propose une régulation encore plus complexe [210]. En effet, en plus de montrer que les cellules germinales contribuent à la détermination de la durée de vie de l'animal d'une façon différente de celle de la partie somatique de la gonade, ces travaux rapportent que cette dernière n'est requise ni pour la relocalisation de DAF-16 dans le noyau des cellules intestinales, consécutive à la suppression des cellules germinales, ni pour l'augmentation de la résistance au stress de ces animaux. Par contre, la gonade somatique serait nécessaire à la régulation de l'expression de gènes cibles spécifiques de DAF-16, mais de façon indépendante de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Autrement dit, la partie somatique de la gonade pourrait influencer la longévité de l'animal en agissant en parallèle de cette voie. La régulation de la longévité par la gonade pourrait fournir un moyen de coordonner le rythme de vieillissement et la reproduction.

II. 3. 2. Régulation de la longévité par des gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Chez *C. elegans*, un large nombre d'individus dont l'expression de gènes essentiels pour la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale est affectée par des mutations hypomorphes ou par un traitement RNAi, présentent une modification de leur durée de vie [211, 212]. De façon plus globale, on appelle mutants Mit (pour mitochondrie) tous les mutants dont l'altération d'un composant de la chaîne respiratoire mitochondriale influence la durée de vie de l'animal [213].

Parmi les gènes répertoriés, on trouve les quatre gènes *clock* (*clk-1*, *-2*, *-3* et *gro-1*) qui constituent une classe de gènes à effets maternels contrôlant le « timing » de nombreux processus physiologiques. Une mutation perte de fonction dans l'un de ces gènes entraîne un phénotype pléiotrope : une augmentation de la durée de vie moyenne des adultes, du cycle cellulaire et un ralentissement du développement ainsi que de la fréquence de différents processus (rythme de « pumping » du pharynx, défécation, ponte et déplacement) [214] qui s'accompagnent d'une résistance accrue au stress [27, 96]. Bien que les phénotypes des

différents mutants *clock* soient similaires, les protéines codées par ces quatre gènes ne semblent pas être en relation [215].

Particulièrement intéressant, le gène *clk-1* code pour une protéine mitochondriale conservée chez la levure, les rongeurs et l'Homme [216]. La protéine CLK-1 est une hydroxylase requise dans la synthèse de l'Ubiquinone (coenzyme Q, CoQ, composant essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale) [217, 218]. Une diminution de l'expression de ce gène augmente la longévité de *C. elegans* par un mécanisme indépendant de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [219] et s'accompagne d'une diminution de l'activité mitochondriale [29] qui se traduit par une réduction de la production de dérivés oxygénés [179]. D'après le phénotype « ralenti » rapporté pour ces mutants, il a été proposé, selon la théorie « rate-of-living » et la théorie oxydative du vieillissement, que l'extension de leur longévité était due à une diminution du métabolisme mitochondrial et de ce fait à celle de la production de ROS. Or, les résultats de Braeckman *et al.* montrent que cette diminution n'est pas suffisante pour induire ce phénotype, et qu'il ne résulte pas non plus de l'augmentation d'expression d'enzymes anti-oxydantes [215]. Par ailleurs, un crible par RNAi réalisé par le groupe de Gary Ruvkun a mis en évidence qu'une inhibition d'autres gènes mitochondriaux provoque également un ralentissement de la respiration mitochondriale, mais entraîne cependant un raccourcissement de la durée de vie des animaux [220]. Ainsi, ces résultats montrent qu'il existe un lien important et très complexe entre longévité, production de dérivés oxygénés et métabolisme mitochondrial, mais qui ne correspond pas aux modèles proposés par les théories « rate-of-living » et oxydative du vieillissement [221]. Une autre hypothèse explique le gain de longévité des mutants *clk-1* par l'altération du mécanisme permettant normalement à la mitochondrie d'informer le noyau du niveau de production d'énergie [29]. En l'absence de signal de production d'ATP par la mitochondrie, la transcription des gènes serait ralentie, afin de réduire l'activité cellulaire et de ce fait la consommation d'ATP ; ces événements auraient pour conséquence une augmentation de la longévité de l'animal (**Figure 7**). Cette suggestion concorderait avec le niveau d'ATP inchangé (voire augmenté) rapporté chez les mutants *clk-1* et le fait qu'il ne diminue que faiblement lors du vieillissement, comparé à celui des animaux sauvages [28]. De cette façon, la production d'énergie serait découplée de la consommation d'énergie chez les mutants *clk-1*.

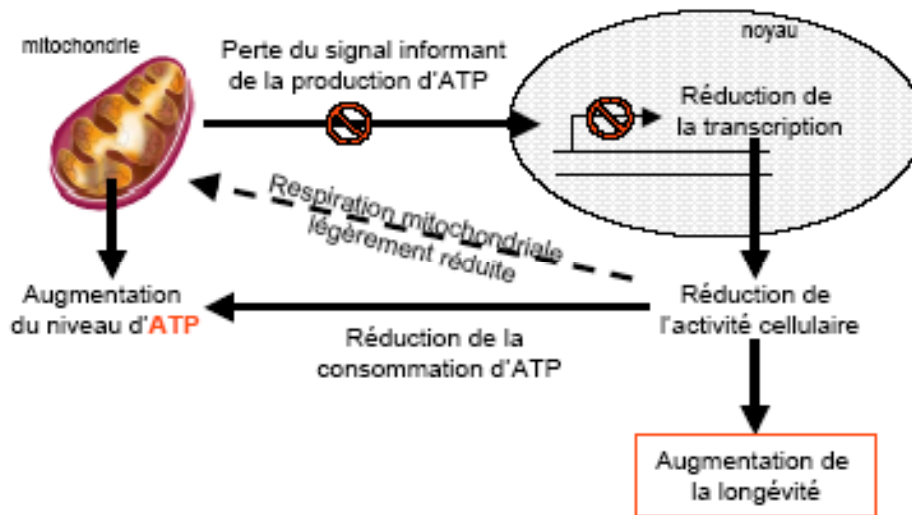


Figure 7: modèle expliquant le gain de longévité des mutants *clk-1* perte de fonction.

L'extension de la durée de vie de ces animaux ne serait pas due à une diminution du métabolisme. Ce modèle propose une relation de cause à effet inversée: suite à une diminution de la transcription des gènes nucléaires, les processus cellulaires seraient ralentis, résultant en une réduction de la consommation d'ATP et en une faible réduction de la respiration mitochondriale. (D'après [25]).

II. 3. 3. Le cas particulier du gérontogène *old-1* dans la régulation de la longévité.

Le gène *old-1* (pour « *overexpression longevity determining* »), initialement baptisé *tkr-1*, code pour un récepteur tyrosine kinase transmembranaire. Contrairement aux gérontogènes précédemment identifiés chez *C. elegans*, dont la perte de fonction cause un phénotype « Age » à la longévité augmentée, c'est une surexpression de *old-1* qui augmente la durée de vie et la résistance au stress des animaux [222]. Par ailleurs, les animaux transgéniques surexprimant *old-1* ne présentent pas d'autres phénotypes normalement associés aux mutants « Age » puisque leur rythme de développement est normal (par opposition aux mutants *clk-1* dont le développement est ralenti) ainsi que leur induction du stade dauer (contrairement aux animaux mutés pour le récepteur à l'insuline/IGF-1, DAF-2, dont 100% rentrent en dauer à 27°C). Toutefois, la longévité et la résistance au stress thermique et aux radiations UV de ces animaux sont supprimées par une perte de fonction de *daf-16* (comme c'est le cas pour les mutants de divers composants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [96]) traduisant une relation épistatique entre OLD-1 et le facteur de transcription DAF-16 [223]. L'expression de OLD-1 étant augmentée chez les animaux mutés sur le gène *age-1* codant pour la PI-3 kinase ou sur *daf-2* mais réduite chez les mutants *daf-16* déficients, OLD-1 est, par conséquent, régulé par la voie DAF-2/Ins/IGF-1 et sous le contrôle transcriptionnel

direct de DAF-16. Ainsi, *old-1* est donc nécessaire à l'extension de la longévité des mutants *age-1* et *daf-2*.

De plus, le fait que l'expression de OLD-1 augmente en réponse à divers stress environnementaux tels que la chaleur, l'exposition aux UV ou encore le manque de nutriments, suggère un rôle putatif de *old-1* dans un mécanisme de réponse à la DR ou à l'hormésis [224].

II. 3. 4. Régulation de la longévité par la modulation de la synthèse protéique.

La régulation de la synthèse protéique est primordiale pour la croissance et le maintien de l'intégrité cellulaire. Chez beaucoup d'organismes, y compris les humains, le vieillissement s'accompagne de profondes altérations de la synthèse protéique [225]. Les mécanismes moléculaires régissant ces changements demeurent inconnus.

Chez les eucaryotes, la traduction des ARN messagers (ARNm) est principalement déterminée par le facteur eIF4E (« eukaryotic initiation factor 4E »), qui se lie à l'extrémité 7-monométhyl-guanosine de tous les ARNm nucléaires [226]. Chez *C. elegans*, il existe cinq gènes codant pour les différents membres de la famille de ce facteur d'initiation (IFE-1, -2, -3, -4, -5) [227] dont seul IFE-2, est capable de réguler la longévité de l'animal [228]. En effet, une étude a montré qu'une perte de fonction spécifique *ife-2*, qui s'exprime le plus abondamment dans les tissus somatiques de l'animal, entraînait une diminution de la traduction, une extension de la durée de vie, ainsi qu'une résistance accrue au stress oxydant. De plus, des tests de RNAi menés sur différents mutants affectant des voies connues pour réguler la longévité, ont montré que le mécanisme par lequel IFE-2 influence la longévité est indépendant des voies de la gonade, de LET-363 (qui régule donc la traduction par un autre mécanisme), de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale et des voies impliquées dans la DR. D'autre part, alors que plusieurs études dans divers organismes associent le vieillissement à une diminution de la synthèse protéique [229], suggérant de ce fait qu'un taux de traduction élevé pourrait retarder le vieillissement [230], les données concernant IFE-2 révèlent un nouveau lien entre synthèse protéique et sénescence. Par conséquent, une régulation négative de la traduction dans les cellules somatiques, dans des conditions appropriées, pourrait faciliter la maintenance et les mécanismes de réparation cellulaires en allégeant l'importante dépense d'énergie liée à la synthèse protéique. IFE-2 appartient donc à une nouvelle voie originale qui module la longévité des cellules somatiques tout en intégrant des signaux environnementaux (tels que la

disponibilité des nutriments) et reproductifs, afin de réguler la synthèse protéique et la maintenance somatique chez *C. elegans*. Ce nouveau mécanisme est en désaccord avec la « disposable soma theory » du vieillissement [231] qui postule que la sénescence est la conséquence passive d'un déséquilibre des mécanismes de réparation et de maintenance du soma au profit de la sauvegarde des cellules germinales.

D'autres travaux rapportent des résultats similaires pour IFG-1, orthologue du facteur d'initiation de la traduction eIF4G [132]. Ils montrent aussi une extension de la longévité lors d'une diminution d'expression de RSKS-1, orthologue de la kinase ribosomale S6 (S6K), régulateur-clé de la traduction des ARNm. Des analyses épistatiques ont permis de mettre en évidence que IFG-1 et RSKS-1 s'intègrent toutefois dans des mécanismes distincts. La régulation de longévité impliquant IFG-1 est indépendante de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, des voies de la DR, de l'autophagie, de LET-363 et de la chaîne respiratoire mitochondriale. De la même façon, RSKS-1 n'intervient pas dans les voies DAF-2/Ins/IGF-1, de la DR, de l'autophagie, et de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais participe à l'action de LET-363 sur la durée de vie des animaux. Ce dernier résultat est cohérent avec l'implication de S6K dans l'action de TOR sur la synthèse protéique chez les mammifères [232, 233].

Une autre étude vient compléter et ne confirmer que partiellement ces résultats [127] ; en effet, le groupe de Cynthia Kenyon montre aussi que l'inhibition de l'expression des facteurs d'initiation de la traduction IFE-2, IFG-1 auxquels vient s'ajouter IFTB-1, orthologue du facteur eIF2 β , augmente significativement la longévité des animaux. Cependant, leurs résultats montrent que ces effets sont dépendants de DAF-16, à l'opposé de ce qui a été montré précédemment pour IFG-1 et IFE-2. Leur étude rapporte également qu'un traitement RNAi à l'encontre des gènes codant pour les protéines ribosomales (RPs) et pour RSKS-1 entraîne aussi une extension de la longévité, mais qu'en revanche, cet effet est complètement indépendant de DAF-16.

Par ailleurs, l'étude menée antérieurement par Henderson *et al.* présente également des résultats ne concordant qu'en partie avec l'ensemble des précédents : les auteurs montrent qu'une diminution de l'expression des facteurs IFG-1 et IFTB-1 entraîne une augmentation de la longévité des animaux, mais que ce mécanisme est indépendant de DAF-16 au cours du développement, tandis qu'il est dépendant de ce facteur de transcription pendant le stade adulte [128].

D'autre part, un crible RNAi mené par Hamilton *et al.* a permis de mettre en évidence l'implication de IFF-1, l'orthologue du facteur d'initiation de la traduction eIF5A chez les mammifères, dans la régulation de la longévité sous la dépendance de DAF-16 [234].

Les nombreuses contradictions quant à la dépendance des mécanismes mis en évidence vis à vis de DAF-16, peuvent s'expliquer par une interprétation différente des analyses épistatiques. En effet, leurs résultats sont soumis à certaines limitations en terme d'interprétation ; par exemple, en l'absence d'effet additifs de deux traitements, on peut conclure qu'ils agissent via un mécanisme commun ; par contre, quand on observe des effets additifs, cela peut révéler qu'ils empruntent des voies distinctes ou bien partagées (dans ce cas, un effet intervient en aval de l'autre) [235].

En résumé, ces différentes études s'accordent à dire que la durée de vie de *C. elegans* peut être prolongée par des mutations affectant des facteurs essentiels de la synthèse protéique, qui permettent ainsi aux cellules de passer d'un état favorisant la croissance à un état privilégiant la maintenance et la résistance au stress. L'engagement du facteur de transcription DAF-16 dans ces régulations reste toutefois à confirmer.

II. 3. 5. Régulation hormonale de la longévité par la voie DAF-2/Ins/IGF-1.

La voie de l'insuline/IGF-1 (Ins/IGF-1) est très conservée et constitue un déterminant clé de la longévité de nombreuses espèces y compris des mammifères [236]. Parmi les nombreux gérontogènes identifiés par criblages à grande échelle beaucoup appartiennent à cette voie de signalisation.

C. elegans s'est révélé un outil très utile dans l'approche génétique du processus de vieillissement. Plus de soixante-dix gènes influençant la durée de vie ont été mis en évidence chez cet animal [237, 238]. Une majorité d'entre eux codent pour des composants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [239] qui détermine la formation du stade dauer (un stade larvaire alternatif, équivalent au stade L3), la résistance au stress, la reproduction et la longévité.

Le premier gène de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 à avoir été mis en évidence par un criblage génétique est le gène *age-1* (pour « ageing alteration-1 ») (qui code pour une PI-3 kinase), nommé ainsi en référence au phénotype « longue vie » des mutants dont l'expression de ce gène est réduite [240] (le terme de phénotype « Age » est ensuite étendu à tous les mutants hypomorphes présentant un gain de longévité). En effet, les mutants *age-1* ont une durée de vie augmentée de près de 60% par rapport aux animaux sauvages. Outre l'extension de leur longévité, leur fréquence d'entrée en dauer ainsi que leur résistance au stress, est plus élevée que celle des animaux sauvages [241].

Par la suite, le travail de Kenyon *et al.* a montré qu'une mutation perte de fonction sur le gène *daf-2* (« *dauer* formation »), double la durée de vie du ver, stimule la formation de dauer et

accroît la résistance au stress et que ces caractéristiques requièrent DAF-16 [17]. La caractérisation de DAF-2 comme le récepteur apparenté à ceux de l'insuline et de l'IGF-1 chez les mammifères [239] et de DAF-16 comme un facteur de transcription, orthologue de FOXO1, FOXO3 et FOXO4 de la famille Forkhead chez les mammifères [242] dévoile la conservation de la voie de l'insuline/IGF-1 chez *C. elegans* et montre l'implication de cette voie dans la régulation de la durée de vie chez le nématode et certains phénotypes associés.

La voie DAF-2/Ins/IGF-1 est active lorsque la nourriture est abondante et fonctionne afin de promouvoir le développement jusqu'au stade adulte, la reproduction et la longévité. Elle peut être activée par la fixation de l'un des trente-sept peptides « insulin-like » du génome de *C. elegans* sur DAF-2 [237, 243, 244], qui code pour l'unique récepteur « insulin-like/IGF-1 » de l'animal [239].

Des études moléculaires ont montré qu'après autophosphorylation par ses domaines tyrosine kinase, DAF-2 active une phosphatidylinositol-3-OH kinase-1 (PI3K), constituée de la sous-unité régulatrice AAP-1 [245] et de la sous-unité catalytique AGE-1 [241]. Cette activation peut être directe mais peut aussi se faire par l'intermédiaire de IST-1, orthologue de l'« Insulin Receptor Substrate » chez les mammifères [245]. La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2) membranaire en phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3). Son activité est « antagonisée » par DAF-18, une phosphatase orthologue du suppresseur de tumeur PTEN (« phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen ») [246]. Le PIP3 permet le recrutement à la membrane et l'activation d'une kinase dépendante du PIP3, PDK-1 [247] qui, à son tour, va activer un complexe multimérique formé des kinases AKT-1, AKT-2 (orthologues de la kinase AKT/PKB chez les mammifères) [248] et de SGK-1 (orthologue des kinases « serum- and glucocorticoid-inducible ») [249]. Ce complexe va alors phosphoryler l'effecteur majeur la voie DAF-2/Ins/IGF-1, le facteur de transcription DAF-16, orthologue de FOXO1, FOXO3 et FOXO4 de la famille Forkhead chez les mammifères [239, 242], qui, rendu inactif, sort alors du noyau [250, 251] (Figure 8). Les trois kinases de ce complexe sont capables d'inhiber l'activité de DAF-16, mais possèdent des fonctions différentes dans la signalisation de DAF-2/Ins/IGF-1. SGK-1 agit en parallèle des kinases AKT-1/AKT-2 et son rôle est crucial dans la régulation du développement post-embryonnaire, la réponse au stress et la longévité [249], alors que AKT-1/AKT-2 sont principalement engagées dans le contrôle du stade larvaire dauer [248].

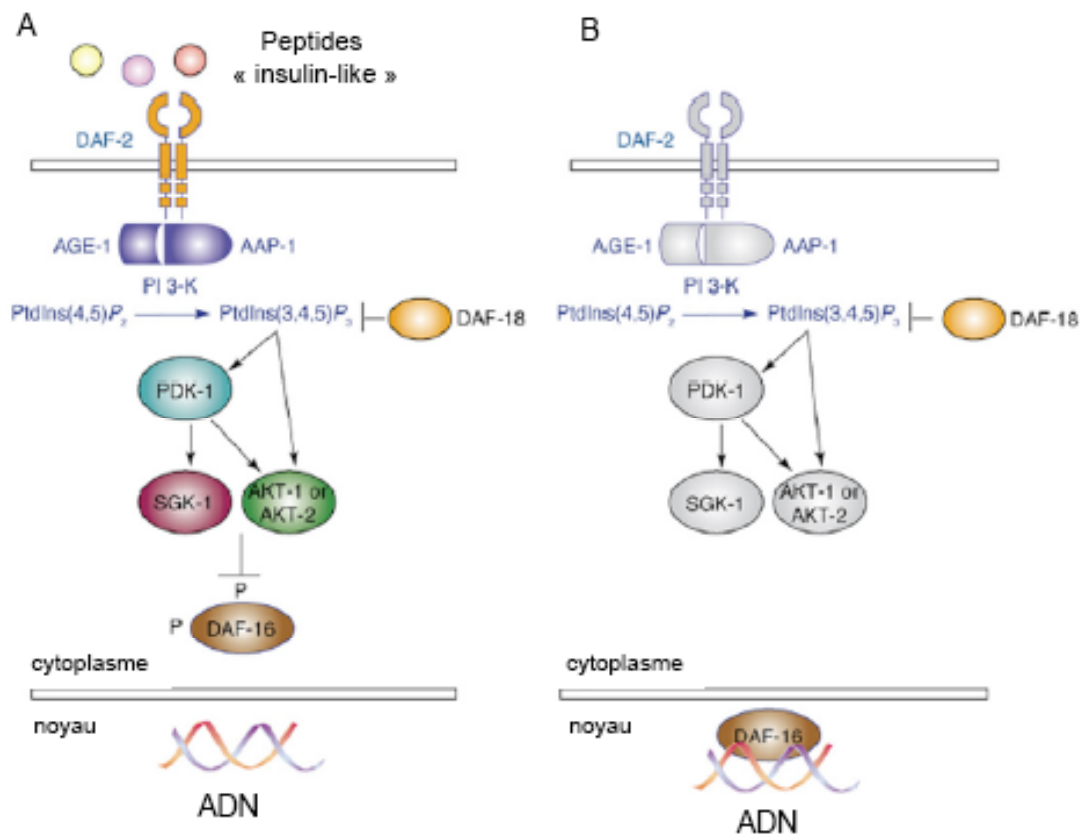


Figure 8: Régulation de la longévité et de la résistance au stress par la voie DAF-2/Ins/IGF-1.

Chez *C. elegans*, comme chez *D. melanogaster* et les mammifères, la longévité est contrôlée par la voie de l'insuline/IGF-1. Le récepteur DAF-2 est l'homologue des récepteurs à l'insuline et au facteur de croissance « insulin-like » des mammifères. (a) En présence de ligands, l'autophosphorylation de DAF-2 initie une cascade de phosphorylations conduisant à l'inhibition du facteur de transcription DAF-16, homologue des facteurs de transcription de la famille Forkhead. La PI-3 kinase, qui se compose d'une sous-unité régulatrice AAP-1 et d'une sous-unité catalytique AGE-1, convertit le phosphatidyl-inositol (4,5)-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂) en phosphatidyl-inositol (3,4,5)-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃). Celui-ci active la kinase PDK-1, qui active à son tour les kinases AKT-1, AKT-2 et SGK-1. La phosphorylation de DAF-16 par ce trio de kinases conduit à sa séquestration cytoplasmique, l'empêchant ainsi d'activer ses gènes cibles. La phosphatase lipidique DAF-18, de la famille PTEN, constitue un régulateur négatif de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. (b) En l'absence de ligand, DAF-16 est transloqué dans le noyau et régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la longévité, de la réponse au stress, du développement et du métabolisme. La mutation de n'importe lequel des composants de la voie en amont de DAF-16, empêche sa phosphorylation ce qui permet sa localisation nucléaire. Ainsi, une mutation de *daf-2*, *age-1*, *pdk-1*, *akt-1* ou *akt-2* entraîne une extension de la durée de vie de l'animal. (D'après [209]).

II. 3. 5. 1. Le récepteur DAF-2 et ses mutants hypomorphes.

Des analyses d'épistasie génétique ont été d'une aide précieuse dans l'établissement de l'ordre dans lequel toutes ces protéines fonctionnent dans la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [252, 253]. Elles se sont révélées particulièrement compliquées dans le cas du récepteur DAF-2, car les différents allèles perte de fonction de *daf-2* se comportent différemment. Par exemple, des comparaisons phénotypiques entre l'allèle canonique *daf-2(e1370)* et l'allèle *daf-2(m41)* ont entre autres montré des variations importantes de longévité et du nombre de leurs descendants en fonction de la température [81, 254].

Afin de mieux comprendre la fonction de DAF-2, une large étude phénotypique a été réalisée par Gems *et al.* en 1998. L'observation des effets « allèles-spécifiques » d'un grand nombre d'allèles de *daf-2* différents a conduit à leur classification en fonction de la « sévérité » des phénotypes de longévité, d'entrée en dauer et de résistance au stress. La classe 1 regroupe les mutants *daf-2* présentant les phénotypes Daf-c (pour « dauer-constitutive »), « Age », et *itt* (pour « *intrinsic thermotolerance* », une résistance accrue au stress thermique), et une faible proportion d'arrêt au stade larvaire L1 à 25,5°C; les mutants de classe 2 présentent des phénotypes plus pléiotropiques, incluant les défauts des mutants de classe 1, auxquels s'ajoutent quelques uns ou plusieurs des défauts suivants : une motilité réduite, une morphologie anormale du corps et de la gonade, une production tardive d'embryons, un pourcentage élevé d'arrêt au stade embryonnaire ou L1, ou une progéniture réduite [255]. D'une manière globale, les phénotypes des mutants de classe 1 sont moins sévères que ceux des mutants de classe 2. Il existe quelques allèles de *daf-2* qui entraînent seulement un phénotype Daf-c très sévère non-conditionnel sans présenter les autres critères phénotypiques des deux classes définies et sont donc considérés à part.

Récemment, il a été montré que l'appartenance d'un allèle à l'une ou l'autre des deux classes phénotypiques concorde avec la localisation de la mutation correspondante sur le récepteur DAF-2 [256]. De façon intéressante, certaines mutations sur DAF-2 coïncident parfaitement avec des mutations retrouvées chez des patients diabétiques insulino-résistants [257-259]. La protéine DAF-2 (1846 acides aminés) possède 35% d'identité avec le récepteur à l'insuline humaine, 34% avec le récepteur à l'IGF-1 (« insulin-like growth factor ») humain et 33% avec le récepteur humain apparenté à celui de l'insuline. Le récepteur DAF-2 se présente sous la forme d'un dimère, chaque monomère se composant d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (**Figure 9**). La sous-unité α est entièrement extracellulaire et comporte une extension N-terminale et un peptide signal, clivés lors de la maturation du pro-récepteur, un domaine de liaison au ligand formé par les régions L1 et L2 séparées par un domaine CR riche en

cystéines et deux domaines fibronectine de type III, FnIII1 et FnIII2 positionnés en C-terminal. La sous-unité β , qui constitue majoritairement la partie intracellulaire du récepteur, se compose d'un domaine fibronectine de type III, FnIII3 à son extrémité N-terminale, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine tyrosine kinase et d'un domaine SH2 en position C-terminale. Les sous-unités α et β sont reliées par un pont disulfure entre la cystéine C827, localisée dans le domaine ID (« insert domain ») de FnIII2 et la cystéine C1126 située dans le domaine FnIII3 [239, 256]

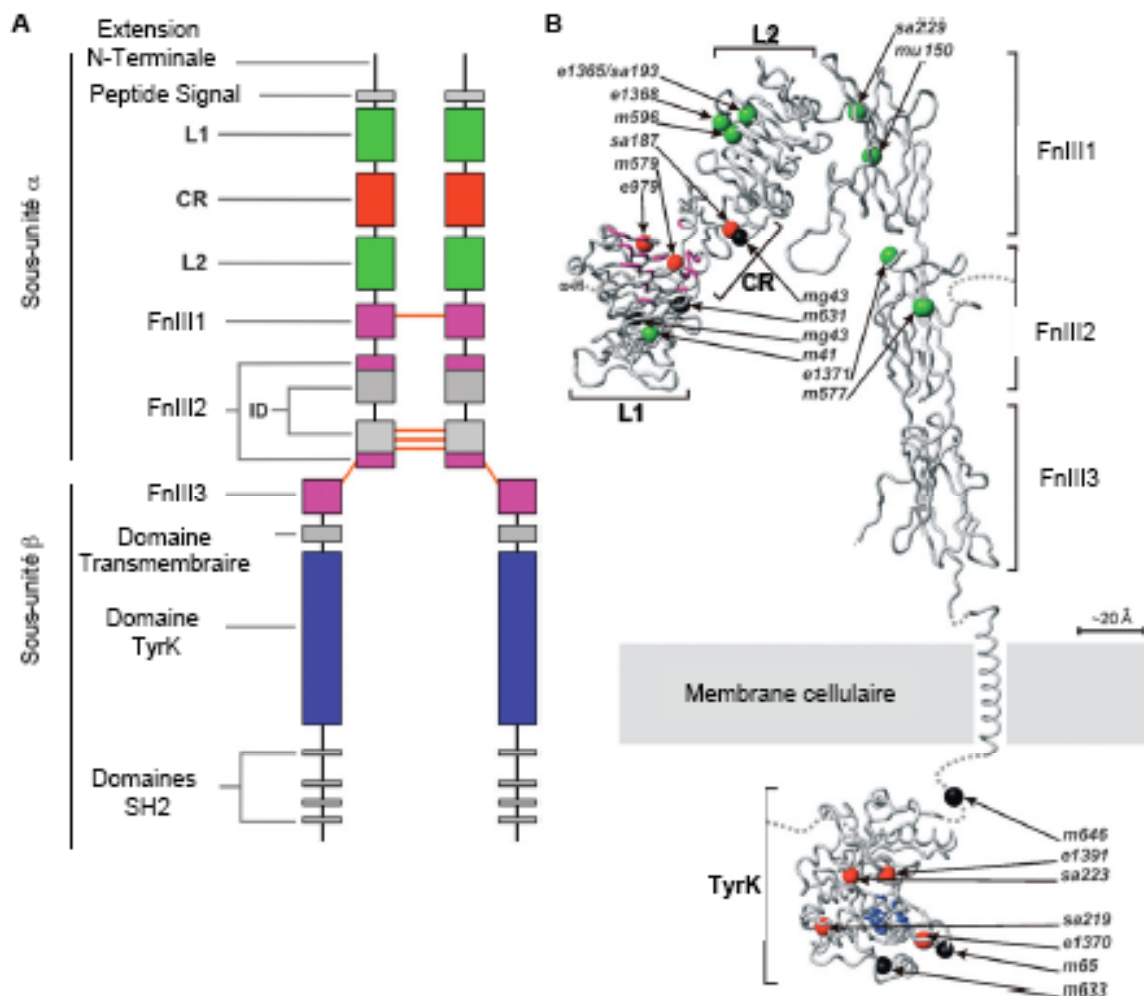


Figure 9: structure du récepteur DAF-2 et position des mutations de classe 1 et de classe 2.

(A). Structure de DAF-2. L'extension N-terminale et le peptide signal sont clivés lors de la maturation du pro-récepteur. Les régions L1, CR pour « cystein rich » et L2 constituent le domaine de liaison au ligand. FnIII1, 2 et 3 sont des domaines fibronectine de type III. Le domaine transmembranaire appartient à la sous-unité β . Le domaine tyrosine kinase et le domaine SH2 forment la queue cytoplasmique du récepteur. Les traits oranges représentent les résidus cystéine impliqués dans les ponts di-sulfure reliant les deux sous-unités α aux positions C706 (FnIII1), C882, C883, and C886 (ID de FnIII2). Les sous-unités α et β de chaque dimère sont rattachées par un pont di-sulfure entre la

cystéine C827 du domaine ID (insert domain) du domaine fibronectine FnIII2 et la cystéine C1126, située dans le domaine FnIII3.

(B) Représentation de la structure secondaire du récepteur DAF-2, montrant la localisation des allèles étudiés par Patel *et al.* En vert, sont représentées les mutations de classe 1, en rouge les mutations de classe 2 et en noir les mutations non conditionnelles. Les régions L1 et CR, prédites pour interagir avec l'IGF-1 et l'insuline humains sont colorées en rose. (à noter le regroupement des mutations de classe 2 et non-conditionnelles dans cette région). Le site actif du domaine tyrosine kinase est coloré en bleu. (D'après [256]).

La description phénotypique de nombreux mutants *daf-2*, la caractérisation des lésions moléculaires de chacun et la comparaison des effets de ces lésions sur la structure du récepteur DAF-2 ont révélé que ces paramètres sont corrélés ; en effet, il a été montré que le site d'une mutation sur *daf-2* détermine ses conséquences phénotypiques. Ainsi, les lésions affectant les mutants *daf-2* de classe 1 se concentrent dans les domaines CR, L2 et FnIII1, 2 ou 3 de la portion extracellulaire du récepteur [239, 256]. D'après la modélisation tridimensionnelle, ces mutations n'affectent pas directement les résidus en contact avec le ligand, mais causent des changements de la conformation du domaine extracellulaire qui vont altérer la liaison du ligand. Des études réalisées sur des cellules de mammifères montrent que ces modifications peuvent également conduire à des défauts de clivage du pro-récepteur et par conséquent à une réduction du nombre de récepteurs fonctionnels présents à la surface de la cellule. De manière intéressante, les mutations affectant les mêmes résidus que les allèles *m577* et *m596* des mutants *daf-2* de classe 1 ont été étudiées sur le récepteur humain à l'insuline et entraînent le même effet (voir RILM sur <http://www.biochem.ucl.ac.uk/rilm/>) [260]. Il est donc possible que les mutants *daf-2* de classe 1 soient caractérisés par une altération de la liaison du ligand mais aussi par une diminution du niveau protéique de DAF-2.

Par contre, les mutations intervenant chez les animaux *daf-2* de classe 2 sont regroupées dans le domaine tyrosine kinase et dans la poche de liaison du ligand, à cheval sur les domaines L1 et CR [239, 256]. Il est prédit en particulier que les mutations au niveau du domaine tyrosine kinase de DAF-2 altèreraient le recrutement de protéines intracellulaires. De façon cohérente, les effets de mutations équivalentes à celles de classe 2 sur le récepteur à l'insuline humain suggèrent une modification de la signalisation intracellulaire [261, 262]. Des expériences menées sur des cellules de mammifères montrent que ces mutations, causent une diminution de l'autophosphorylation du récepteur au niveau des domaines tyrosine kinase. Cependant, la phosphorylation de IRS-1 [263] et le recrutement de la PI-3 kinase n'est pas entièrement bloquée et s'approche même du niveau sauvage en présence de fortes concentrations

d'insuline [264]. En revanche, dans ces mêmes cellules, il a été simultanément constaté l'absence de phosphorylation de la protéine adaptatrice Shc (« Src homologous and collagen-like ») qui se lie normalement au récepteur activé ainsi qu'une absence d'activation de Ras et de la cascade des MAP kinases. Ces observations suggèrent que, chez *C. elegans*, les mutations de classe 2 affectent peu la voie DAF-2/AGE-1 mais qu'elles altèrent davantage d'autres voies émergeant du récepteur DAF-2. Des expériences d'épistasie génétique ont d'ailleurs rapporté qu'une mutation gain de fonction de *age-1* ne permet pas de supprimer l'extension de longévité observée chez les mutants de classe 2, indiquant que ce n'est donc pas une diminution de la signalisation par la PI-3 kinase qui induit le phénotype de ces animaux. Par conséquent, ces résultats reflèteraient l'existence d'une bifurcation du signal en aval du récepteur DAF-2. Les travaux de Nanji *et al.* ont étayé cette hypothèse et montrent que, de façon comparable aux mammifères, la seconde voie pouvant transduire le signal reçu par DAF-2 serait la voie LET-60/Ras [265] (**Figure 10**). Cette voie impliquerait *let-60*, *sos-1*, l'orthologue de Sos qui code pour une protéine GEF (« Guanine nucleotide Exchange Factor ») et *sem-5*, qui code pour l'orthologue de la protéine adaptatrice Grb2. Ils montrent aussi que la voie LET-60 semble agir de concert avec la voie DAF-2/Ins/IGF-1 pendant le développement et à son encontre pendant le stade adulte.

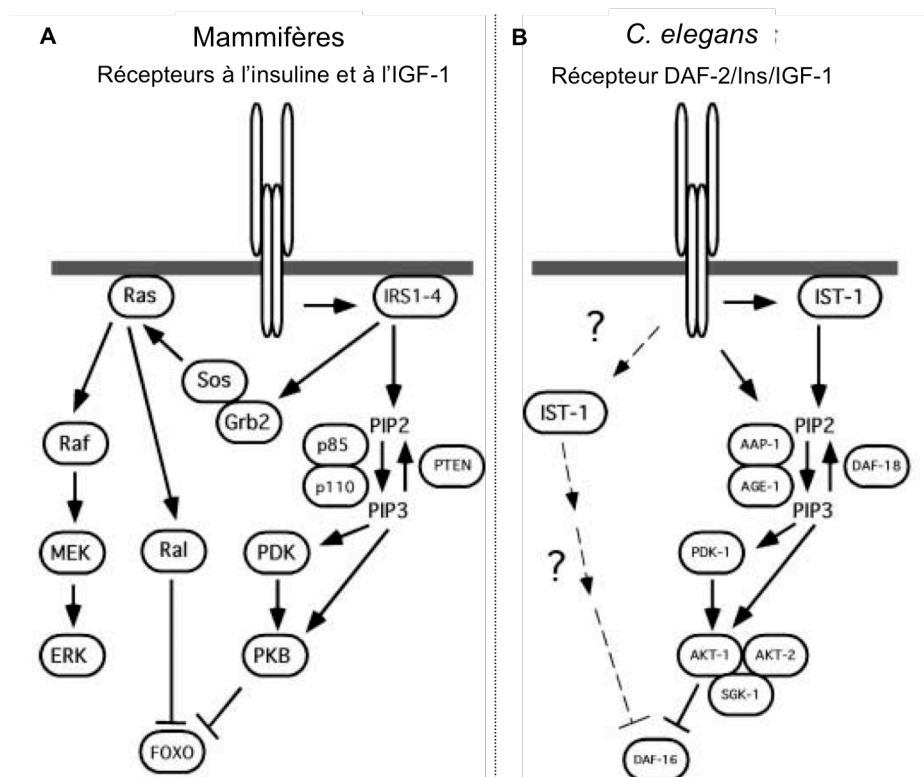


Figure 10: voie de l'insuline/IGF-1 chez *C. elegans* et chez les mammifères.

(A). Chez les mammifères, la voie Ras se trouve en aval de celle de l'insuline. La protéine adaptatrice Grb2 se lie aux résidus tyrosine phosphorylés de IRS1-4 (« insulin receptor substrate ») via son

domaine SH2. Le GEF (« Guanine nucleotide Exchange Factor ») Sos se lie au domaine SH3 de Grb2 et active Ras, en catalysant l'échange d'un GDP par un GTP sur cette GTPase. Ras se lie et active à son tour la sérine/thréonine kinase Raf. Une cascade de phosphorylations conduit ensuite à l'activation séquentielle de la kinase MEK puis de la MAPkinase ERK. Ras peut également activer un GEF de la GTPase Ral (qui ne figure pas sur le schéma), qui stimule à son tour Ral et conduit à une inhibition de FOXO.

(B). Chez *C. elegans*, des analyses d'épistasie génétique suggèrent l'existence d'autres voies de signalisation en aval de DAF-2, parallèles à AGE-1 et convergeant sur DAF-16. Les travaux de Nanji *et al.* et une comparaison avec les voies de l'insuline et de l'IGF-1 chez les mammifères suggèrent la voie Ras comme candidat potentiel. Ils postulent que le récepteur DAF-2 transduit le signal en utilisant la voie *let-60*, orthologue de Ras chez les mammifères, de la même façon que pour la voie impliquant AGE-1. (D'après [265]).

Par ailleurs, la voie LET-60 est connue pour intervenir dans de nombreux processus cellulaires, tels que le développement du système d'excrétion et de la vulve, dans la migration des myoblastes sexuels, dans la progression vers le stade pachytène de méiose I et dans la fonction des neurones sensoriels [266-268].

Ainsi, une réduction sévère de la transduction du signal par LET-60/Ras et une altération moindre de la voie DAF-2/AGE-1 s'ajouteraient aux caractéristiques des mutants *daf-2* de classe 2.

En outre, alors qu'une mutation gain de fonction de *age-1* ne supprime pas l'extension de longévité des mutants de classe 2 (ex : *daf-2(e1370)*), elle est capable d'abolir celle des mutants de classe 1 (ex : *daf-2(e1365)*), montrant dans ce cas, que les mutations de classe 1 affectent particulièrement la voie DAF-2/AGE-1 et favorisent la transduction du signal résiduel par une voie parallèle qui convergerait au final sur DAF-16 (**Figure 11**).

En résumé, la localisation des mutations sur *daf-2* définit la classe d'appartenance des mutants, leur phénotype et la voie de signalisation privilégiée en aval de DAF-2.

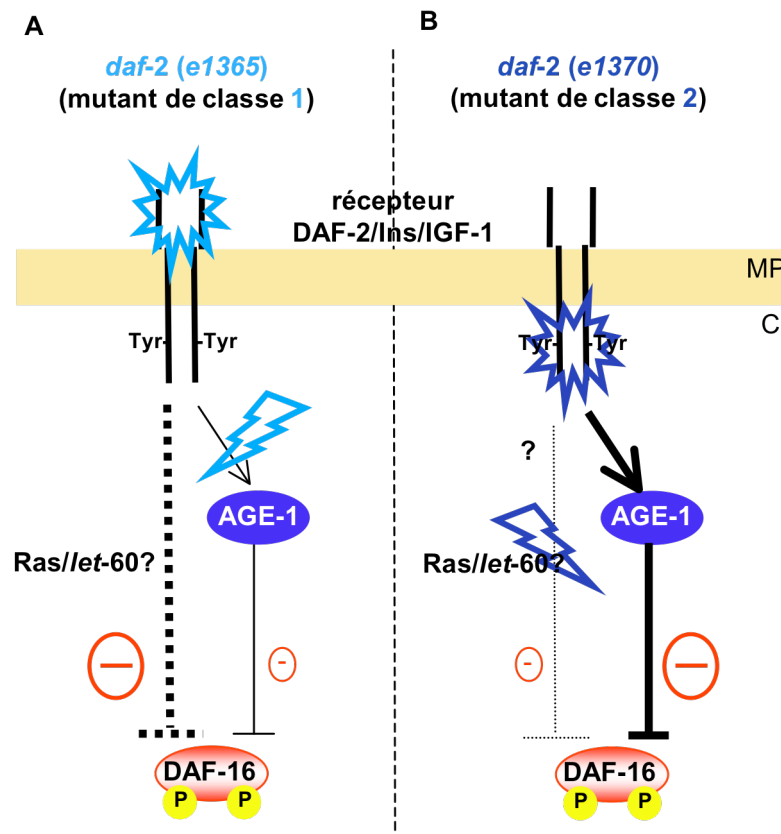


Figure 11: Voies de signalisation mises en jeu dans les mutants *daf-2* hypomorphes de classe 1 (ex: *daf-2(e1365)*) et de classe 2 (*daf-2(e1370)*).

(A). L'allèle *e1365* appartient à la classe 1, la mutation se localise dans le domaine de liaison au ligand, ce qui entraîne en aval de DAF-2 une altération de la voie impliquant AGE-1, alors que la voie parallèle, potentiellement la voie Ras/let-60 est très peu affectée.

(B). L'allèle *e1370* appartient à la classe 2, la mutation se localise dans le domaine tyrosine kinase cytoplasmique, ce qui entraîne en aval de DAF-2 une altération de la voie parallèle à AGE-1, alors que la voie impliquant AGE-1 reste en partie fonctionnelle.

Différentes voies sont donc empruntées par les deux mutants. (D'après [255, 256]).

II. 3. 5. 2. Implication de DAF-16 dans les différents phénotypes des mutants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1.

Outre les mutations sur le gène codant pour le récepteur DAF-2, des mutations affectant les gènes des kinases constituant la cascade inhibitrice convergeant sur DAF-16, prolongent la durée de vie des animaux ou entraînent la formation constitutive de larves dauers (phénotype Daf-c) [17, 269, 270], alors que des mutations au niveau de la phosphatase DAF-18 supprime le gain de longévité des autres mutants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 ou empêche l'entrée en dauer (phénotype Daf-d pour « dauer-defective ») [81, 271]. De plus, la

plupart, si ce n'est la totalité des mutants « longue vie » de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 présentent une résistance accrue à des stress environnementaux tels que le stress oxydant (exposition au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou au paraquat (méthyl viologène) par exemple) [91], l'hypoxie [92], le stress thermique [93, 94], l'irradiation UV [96] et l'exposition aux métaux lourds [97], notamment grâce à une induction de l'expression de nombreux gènes de réponse au stress [95, 97, 272-274].

En effet, lorsque l'inhibition sur DAF-16 est levée, par une inactivation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, notamment quand les conditions environnementales sont modifiées (surpopulation, manque de nourriture, augmentation de la température, stress oxydant), DAF-16 transloque rapidement vers le noyau ; DAF-16 peut alors transactiver de multiples gènes cibles impliqués dans le développement de l'animal, sa longévité, sa résistance aux stress thermique et oxydant et son entrée en dauer [95, 275-286].

Toutefois, la seule localisation nucléaire de DAF-16 dans le noyau ne suffit pas à augmenter la durée de vie et la résistance au stress en réponse à une diminution du signal médié par la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [276]. Cet effet s'explique par le fait que DAF-16 intègre également des signaux en provenance d'autres voies de signalisation. Par exemple, dans de multiples conditions de stress (thermique, oxydant, dommages à l'ADN...), la kinase JNK-1 (orthologue de la « c-Jun N-terminal kinase » des mammifères), AMPK, la p38 MAPkinase ou encore CST-1 (orthologue de la kinase MST1 des mammifères) activent de façon spécifique DAF-16 [109, 287-289], ce qui entraîne sa translocation dans le noyau et son interaction avec divers co-facteurs, en fonction des résidus sur lesquels il a été phosphorylé. La façon dont ces différentes kinases interagissent pour réguler l'activité de DAF-16 demeure mal connue ; l'établissement d'une corrélation entre la spécificité des kinases et celle que confèrent les co-facteurs nucléaires permettrait de décoder le mode d'action de DAF-16.

Outre sa régulation post-traductionnelle par phosphorylation, DAF-16 est également modifié par ubiquitination et acétylation. Récemment l'ubiquitination de DAF-16 par RLE-1, une E3 ubiquitine ligase très conservée, a été mise en évidence, conduisant à la déstabilisation du facteur de transcription [290]. D'autre part, l'action de la déacétylase SIR-2.1 influence la localisation nucléaire de DAF-16 et « antagonise » la phosphorylation de DAF-16 par le complexe AKT-1/AKT-2/SGK-1 qui provoque sa rétention cytoplasmique [121].

Ainsi DAF-16 intègre de multiples informations transmises par des voies parallèles à la voie DAF-2/Ins/IGF-1 qui renseignent sur les conditions environnementales (absence de nourriture, surpopulation, stress thermique et oxydant, UV ...) [275] et constitue le régulateur majeur de la survie de l'animal. Les propriétés de DAF-16 semblent réconcilier plusieurs théories sur le vieillissement : la théorie du vieillissement programmé, les théories

évolutionnistes et la théorie oxydative. En effet, l'implication de DAF-16 dans une voie de signalisation régulant la longévité favorise l'idée d'un contrôle génétique du vieillissement, pourtant ce facteur de transcription est aussi capable d'adapter la mobilisation des ressources dédiées à la croissance et à la reproduction ou au contraire à la survie, conformément au concept évolutionniste et enfin, DAF-16 contribue à l'extension de la longévité en modulant l'expression de gènes de résistance au stress. De cette façon, DAF-16 constitue un « commutateur » central pour l'obtention de phénotypes majeurs dans la vie de *C. elegans*.

II. 3. 5. 3. Les co-régulateurs de DAF-16.

Pour contrôler l'expression de certains de ses gènes cibles, DAF-16 nécessite donc d'agir de concert avec différents facteurs de transcription ou divers co-facteurs en fonction de la spécificité du phénotype requis et de la voie parallèle mise en jeu.

II. 3. 5. 3. a) SMK-1.

Une étude récente du groupe d'Andrew Dillin montre que le facteur de transcription SMK-1 (« suppressor of MEK1 ») est requis pour l'extension de longévité des mutants *daf-2* réduction de fonction. SMK-1 joue un rôle essentiel dans la longévité médiée par la voie DAF-2/Ins/IGF-1, en modulant directement la spécificité transcriptionnelle de DAF-16 ; SMK-1 interagit avec DAF-16 pour réguler l'immunité innée de l'animal et sa résistance au stress UV et au stress oxydant, sans pour autant affecter les autres processus régulés par cette voie tels que la résistance au stress thermique ou l'entrée en dauer [90, 291].

II. 3. 5. 3. b) HSF-1.

De la même façon, le facteur de transcription HSF-1 (« Heat Shock transcription Factor-1 ») est requis pour l'extension de la longévité des mutants perte de fonction *daf-2* et pour leur résistance accrue au stress thermique [95, 292, 293]. L'expression de la protéine chaperonne HSP-16 est induite de façon conjointe par HSF-1 et DAF-16 pour engendrer ces phénotypes [274, 294].

II. 3. 5. 3. c) SIR-2.1.

Par ailleurs, indépendamment de son rôle dans la DR, SIR-2.1 serait également impliqué dans la réponse au stress thermique [89] ; en effet, dans ces conditions de stress, SIR-2.1 interagit physiquement avec DAF-16 par le concours des protéines FTT (Fourteen-Three-Three), orthologues des protéines 14-3-3 qui jouent ici le rôle d'adaptateurs moléculaires, et le complexe formé permet l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de DAF-16 [295]. Dans ce contexte SIR-2.1 et les protéines 14-3-3 agiraient en tant que co-activateurs de DAF-16.

II. 3. 5. 3. d) BAR-1.

Pour ce qui est de la réponse au stress oxydant un autre co-activateur de DAF-16 a été mis en évidence : BAR-1, un des trois orthologues de la β -caténine des mammifères (WRM-1 et HMP-2 sont les deux autres orthologues chez *C. elegans*), acteur majeur de la voie canonique WNT, engagée dans le développement de l'animal [296]. Indépendamment de sa fonction dans la voie Wnt, BAR-1 s'associe à DAF-16 et active des gènes de réponse au stress oxydant parmi lesquels la superoxyde dismutase-3 *sod-3* [297].

II. 3. 5. 3. e) KRI-1.

DAF-16 interagit également avec KRI-1. Cette protéine constitue un élément-clé dans la régulation de la longévité par l'appareil reproducteur (voir paragraphe II. 3. 1.), mais requiert l'activité de DAF-16. KRI-1 participe à la localisation nucléaire et l'activation de DAF-16 pour médier la longévité des animaux dépourvus de gonade [208].

SMK-1, HSF-1, BAR-1, le complexe SIR-2.1/FTT et KRI-1 constituent donc des co-régulateurs des effets spécifiques de DAF-16 [89] (**Figure 12**) qui renforcent encore l'idée selon laquelle les mécanismes de résistance au stress sont fondamentalement importants pour la longévité.

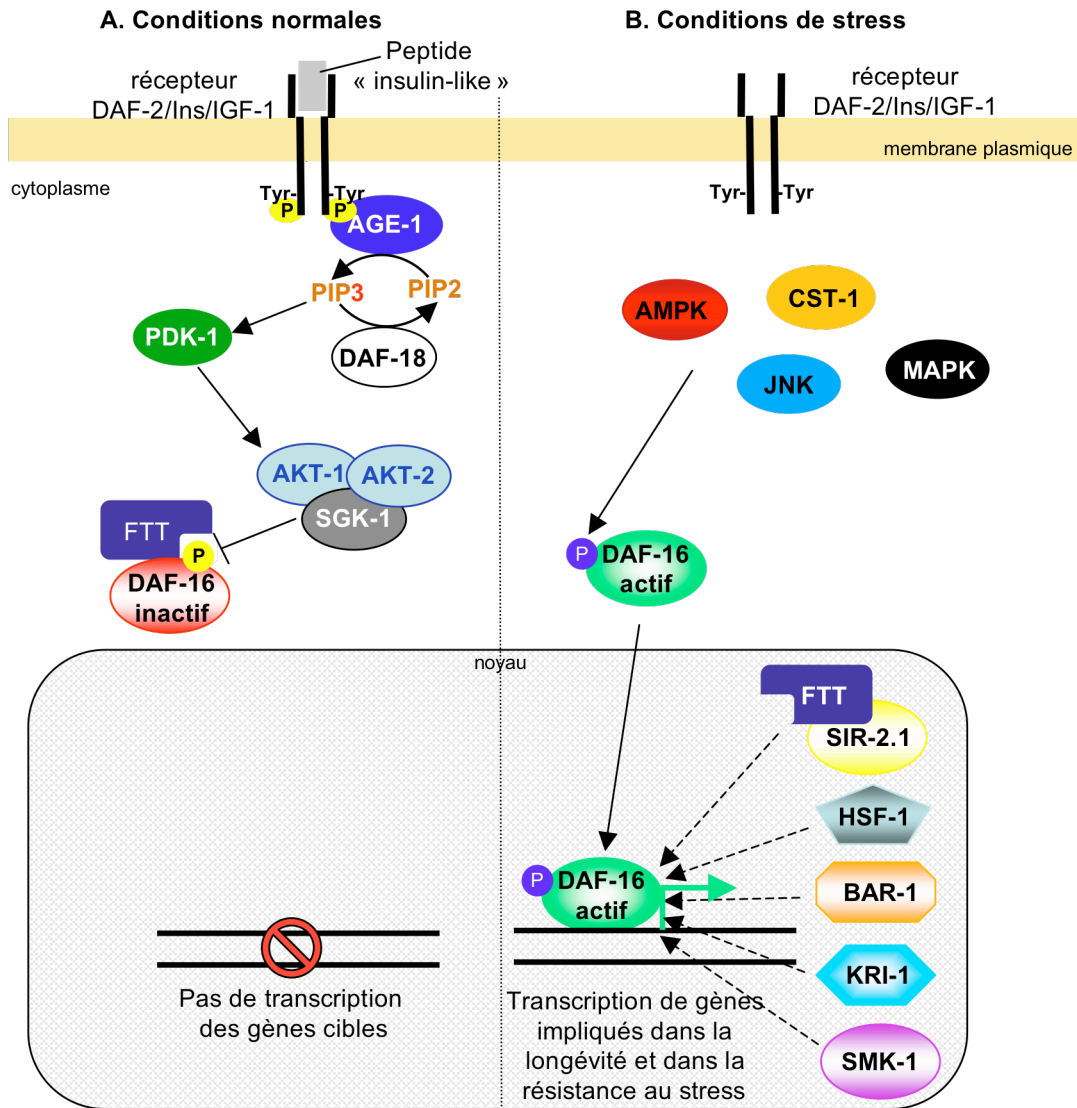


Figure 12: exemples de co-facteurs de DAF-16.

(A). En conditions normales, DAF-16 subit une phosphorylation inhibitrice par la voie DAF-2/Ins/IGF-1 et est séquestré dans le cytoplasme par les protéines FTT. (B). Suite à un stress, DAF-16 peut être activé par différentes kinases (JNK, AMPK, CST-1, MAPK selon la nature du stress...), et se relocalise dans le noyau. Il peut alors interagir avec différents co-facteurs qui spécifient son activité. Le complexe FTT/SIR-2.1 est requis pour activer des gènes de réponse au stress thermique et oxydant. HSF-1 coopère avec DAF-16 pour induire l'expression des protéines de choc thermique HSP. DAF-16 interagit avec BAR-1 en cas de stress oxydant. Chez des vers dépourvus de cellules germinales, DAF-16 est activé par KRI-1. En cas de stress oxydant, de stress UV ou lors d'une exposition à un pathogène, DAF-16 peut également être activé par SMK-1. L'intervention des protéines FTT en tant que co-activateurs n'a été rapportée que dans le cas d'un stress thermique avec la participation de SIR-2.1; mais il n'est pas exclu qu'elles interviennent dans d'autres complexes. Dans chacun de ces cas, la délétion d'un co-facteur supprime l'extension de longévité et la résistance accrue au stress dépendante de DAF-16. (D'après [89, 289]).

II. 3. 5. 3. f) Le cas particulier de SKN-1.

Le facteur de transcription SKN-1, dont la première fonction identifiée est l'activation de l'expression d'enzymes de défense contre les pathogènes [144], participe à l'extension de la longévité en réponse à la DR, via son expression dans les neurones ASI (voir paragraphe II. 1. 1. 5.). Son expression dans les cellules intestinales l'implique de façon plus générale dans la régulation de la réponse au stress ; en conditions normales, la kinase GSK-3 (« glycogen synthase kinase-3 ») phosphoryle SKN-1 et l'empêche ainsi de se localiser dans le noyau et d'être constitutivement actif en l'absence de stress [147]. En réponse à un stress oxydant, SKN-1 s'accumule dans le noyau des cellules intestinales et active la transcription de gènes codant entre autres pour la glutathione S-transférase, la NADPH-quinone oxydoréductase et la superoxyde dismutase. La relocalisation nucléaire de SKN-1 dans ces conditions dépend de son activation par la MAP kinase p38 (MPK pour « Mitogen Activated Protein Kinase ») [298].

Un article récent rapporte que, la voie DAF-2/Ins/IGF-1 inhibe directement SKN-1 parallèlement à son action sur DAF-16 et que tout comme DAF-16, SKN-1 est requis pour l'extension de la longévité et la résistance au stress des mutants *daf-2* hypomorphes. De plus, les auteurs montrent que les fonctions transcriptionnelles de DAF-16 et SKN-1 ne se recoupent que partiellement et ne sont donc pas redondantes. Plus qu'un simple co-facteur de DAF-16, SKN-1 constituerait donc le second facteur de transcription directement inhibé par de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 via l'action des kinases AKT-1/AKT-2 et SGK-1 et un nouvel effecteur à part entière de cette voie [148] (**Figure 13**). Ainsi, l'expression concomitante des deux facteurs de transcription dans les cellules intestinales du ver permettrait la régulation de la longévité et de la résistance au stress. Il serait désormais très intéressant de déterminer dans quelle mesure les deux facteurs de transcription coopèrent ou agissent indépendamment l'un de l'autre dans des conditions normales, de stress ou encore quand la signalisation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 est réduite.

Cette étude offre un exemple supplémentaire du lien étroit entre longévité et mécanismes de défenses contre le stress.

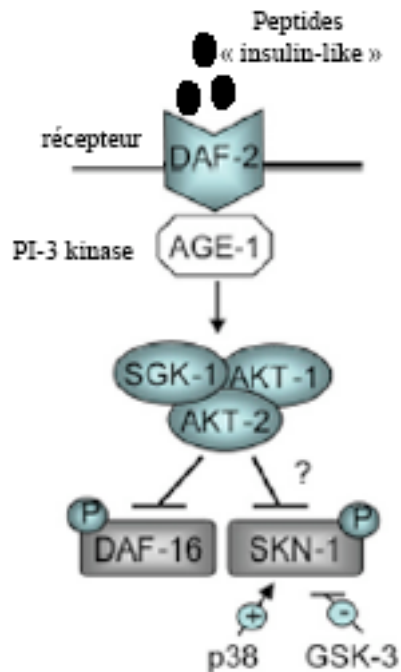


Figure 13: modèle de régulation de SKN-1 par la voie DAF-2/Ins/IGF-1. De la même façon que pour DAF-16, SKN-1 subirait une phosphorylation inhibitrice par le trio de kinases SGK-1/AKT-1/AKT-2. De plus, la kinase GSK-3 contribuerait également à son maintien à l'état inactif par phosphorylation en conditions normales. Au contraire, la MAP kinase p38 activerait SKN-1 en conditions de stress. (D'après [148]).

II. 3. 5. 4. Les cibles transcriptionnelles de DAF-16.

De nombreux chercheurs se sont intéressés aux cibles de DAF-16 afin de mieux comprendre les processus sous-jacents à l'extension de longévité des mutants *daf-2* et des larves dauers. Etant donnée la corrélation entre durée de vie et résistance au stress [86-90, 299], les premières études se sont focalisées sur l'expression de gènes de réponse au stress. Par la suite, plusieurs méthodes ont été utilisées pour révéler un nombre plus grand de gènes spécifiquement régulés par DAF-16 : des études comparatives des génomes de *C. elegans* et de *D. melanogaster*, des expériences de microarrays, des analyses de SAGE (« Serial Analysis of Gene Expression ») et une méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) [277-279, 282, 300]. Les gènes identifiés sont impliqués dans le métabolisme, la production d'énergie, la résistance au stress, les défenses contre les infections bactériennes et dans la détoxification de toxines. Pour ne citer que quelques exemples, les gènes de la superoxyde dismutase mitochondriale *sod-3* [272] et des métallothionines *mtl-1* et *mtl-2* impliquées dans la détoxification des métaux [97], les gènes des catalases cytosolique *ctl-1* et

peroxysomale *ctl-2* [301], ainsi que de plusieurs petites protéines de réponse au choc thermique *hsp-16*, *hsp-70* et *hsp-90* [274] sont apparus positivement régulés par DAF-16 chez des mutants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Murphy *et al.* ont montré que ces gènes sont partiellement responsables du gain de longévité conféré par l'activation de DAF-16, et ont confirmé à nouveau le lien entre gain de longévité et résistance au stress accrue, confortant ainsi la théorie oxydative du vieillissement. D'autres gènes, codant pour les lysosomes *lys-8* et *lys-9* (impliqués dans la défense antimicrobienne), des gènes participant au métabolisme des acides aminés et à la dégradation protéique dépendante du protéasome ainsi que des gènes codant pour des enzymes participant à la gluconéogenèse, se sont avérés posséder les mêmes caractéristiques.

Par ailleurs, ces expériences de microarrays ont également mis en évidence des gènes transcriptionnellement activés par DAF-16 mais dont la fonction demeure inconnue. A titre d'exemple, les gènes codant pour le récepteur tyrosine kinase transmembranaire OLD-1 et pour la protéine sécrétée, riche en cystéine SCL-1 sont également des cibles de DAF-16 et constituent des régulateurs positifs de la longévité et de la résistance au stress, mais leur rôle précis reste à élucider [223, 301, 302].

Enfin, l'expression d'autres gènes, parmi lesquels de nombreux gènes impliqués dans la croissance et la reproduction, peut, au contraire, être réprimée par DAF-16 [88]. De manière intéressante, le gène *ins-7* qui code pour un ligand « insulin-like », agoniste du récepteur DAF-2 appartient à ce groupe de gènes. Cette observation suggère que ce ligand participe à une boucle positive de régulation par rétro-contrôle de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, et permettrait ainsi de répandre le signal à travers l'animal entier afin que toutes les cellules y répondent de la même façon.

L'ensemble des gènes-cibles de DAF-16 contribuent à réguler la longévité de l'animal.

II. 3. 5. 5. Importance de l'expression temporelle et spatiale (tissu-spécifique) de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans la régulation de la longévité de *C. elegans*.

II. 3. 5. 5. a) Spécificité temporelle de l'expression de la voie DAF-2/Ins/IGF-1.

Plusieurs des mutants « longue vie » de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 présentent une altération de la voie tout au long de leur vie. Des travaux récents ont eu pour but de peaufiner cette observation en déterminant plus précisément les fenêtres de temps pendant lesquelles une réduction de la voie de l'insuline suffisait à engendrer les différents phénotypes (dauer,

résistance au stress, reproduction et longévité) contrôlés par la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Pour ce faire, le groupe de Cynthia Kenyon a diminué l'expression du récepteur DAF-2 par la méthode de RNAi « feeding » pendant le développement larvaire ou à partir du stade adulte afin de déterminer le rôle de la voie dans ces deux intervalles de temps [303]. Cette étude a montré que la voie DAF-2/Ins/IGF-1 agissait spécifiquement pendant le développement pour réguler la formation des larves dauer et la reproduction, exclusivement pendant la période adulte et plus particulièrement pendant la période reproductive pour contrôler la longévité de l'animal et tout au long de sa vie pour réguler la résistance au stress. De plus, ce groupe a pu mettre en évidence que la voie DAF-2/Ins/IGF-1 régule ces différents aspects indépendamment les uns des autres, suggérant la possibilité de manipuler cette voie pendant la période adulte dans le but d'améliorer la qualité et la durée de vie sans pour autant affecter la croissance et la reproduction.

II. 3. 5. 5. b) Spécificité tissulaire de l'expression de la voie DAF-2/Ins/IGF-1.

La voie DAF-2/Ins/IGF-1 ne représente qu'une étape dans une plus large cascade de signalisation affectant la longévité ; la première preuve soutenant cette hypothèse a été apportée par l'observation d'un gain de longévité chez des animaux mosaïques pour lesquels le récepteur DAF-2 a été muté dans certaines cellules [304]. Ainsi, les cellules mutées pour DAF-2 seraient capables d'envoyer un signal « pro-longévité » aux cellules voisines de phénotype sauvage. Quels tissus sont capables de produire ce signal ? Il a été montré que l'activité de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans l'intestin de *C. elegans*, qui fait office de tissu adipeux, est primordiale pour réguler la longévité de l'animal [305]. L'importance de son activité dans les neurones sensoriels pour médier la longévité est plus controversée : alors que des travaux montrent que l'expression de DAF-2 sauvage dans les neurones de mutants *daf-2* hypomorphes supprime totalement leur gain de longévité [304, 306], d'autres n'observent aucune variation et rapportent même que l'activité de DAF-16 dans les neurones ne contribue que de façon limitée (5 à 20%) au phénotype « longue vie » des mutants *daf-2* perte de fonction ; en revanche, elle semble plus importante pour la formation des larves dauer [305].

La voie DAF-2/Ins/IGF-1 contrôle au moins deux types de signaux. Premièrement, elle régule par rétro-contrôle la production des nombreux ligands du récepteur DAF-2 qui participent donc à une boucle d'auto-activation de la voie au niveau de chaque cellule (régulation « cellule-autonome »). Inversement, une activité accrue de DAF-16 entraîne une

augmentation de l'expression du facteur de transcription dans les autres tissus [305] et inhibe l'expression du gène « insulin-like » *ins-7*, présumé agoniste de DAF-2 [279].

Deuxièmement, des expériences conduites sur des animaux mosaïques exprimant DAF-16 sauvage uniquement dans les tissus intestinaux et neuronaux ont montré que son activation suffisait à étendre la durée de vie de l'animal [305]. Cette observation suggère que depuis un tissu donné, DAF-16 génère des signaux auxquels les cellules des autres tissus répondent par une prolongation de la durée de vie indépendamment de la présence du facteur de transcription. Autrement dit, ces signaux sont différents de ceux impliqués dans la boucle d'auto-amplification et agissent de façon « cellule-non-autonome » en parallèle de celle-ci pour répandre l'information vers les autres tissus. Deux cibles transcriptionnelles de DAF-16 sont candidates pour cet effet : les gènes *scl-1* [302] et *old-1* [223], tous deux impliqués dans l'extension de la longévité des mutants *daf-2* hypomorphes.

II. 3. 6. Composante stochastique du vieillissement chez *C. elegans*.

Le vieillissement est généralement défini et étudié à l'échelle d'une population. Par exemple, les études menées dans le but d'identifier des gènes ou des drogues qui influencent le processus de vieillissement recherchent un effet statistiquement significatif sur les durées de vie moyenne et maximale d'une population d'animaux. Malgré la contribution d'une composante génétique au mécanisme de vieillissement, un aspect énigmatique réside dans le fait que les membres d'une population génétiquement homogène présentent des longévités individuelles très variées.

En effet, au sein de populations isogéniques de *C. elegans*, les animaux présentent toutefois de grandes variations individuelles de la longévité ; à partir d'un certain âge, certains individus meurent plus précocement que d'autres, bien que de causes naturelles, et ce phénomène s'illustre dans la courbe sigmoïde caractéristique de la survie d'une population (**Figure 14**). Ce constat suggère l'intervention d'une composante stochastique dans les processus de vieillissement et de mort. En fait, l'importance de la composante génétique dans la détermination de la longévité ne s'élèverait que de 20 à 50% [79, 307]. Des travaux ont été conduits afin d'intégrer la variable stochastique dans le modèle mathématique conventionnel de Gompertz [308] originalement établi pour reproduire les courbes de survie humaines [309-312].

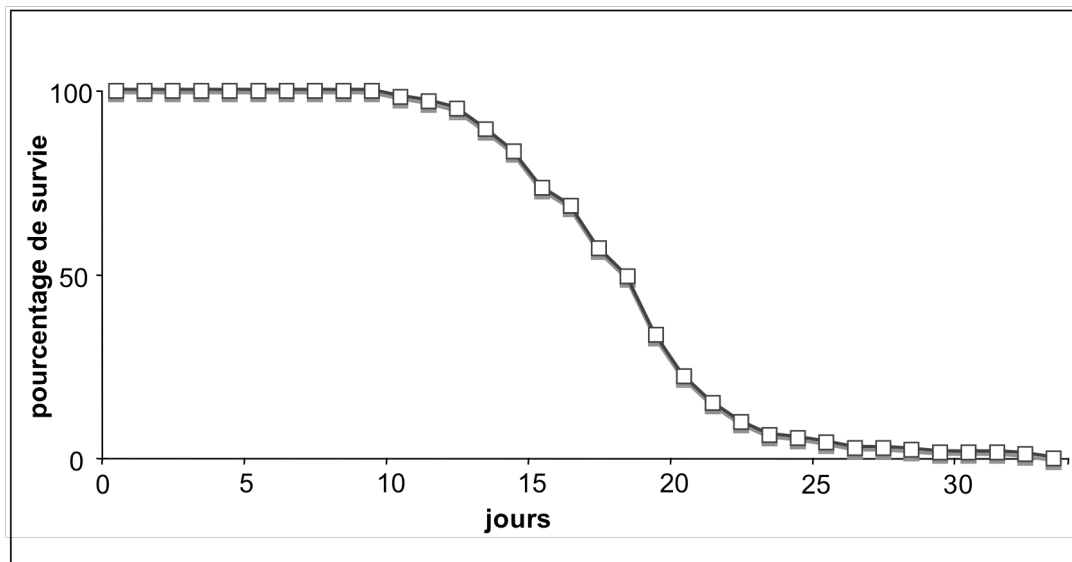


Figure 14: courbe de longévité d'une population de *C. elegans* sauvage (N2) élevée à 20°C, sur *E.coli* (OP50).

La courbe démarre au premier jour du stade adulte, à partir duquel les animaux décédés sont comptabilisés tous les jours. Pendant plus d'une semaine, la population montre 100% de survie; passé ce délai, les animaux meurent progressivement: le premier animal meurt au dixième jour tandis que le dernier meurt le trente-quatrième jour. Ce phénomène reflète l'intégration d'une composante stochastique dans le vieillissement.

D'autre part, nombre d'études s'intéressant aux phénotypes liés au vieillissement de *C. elegans* (perte de mobilité, arrêt de la prise alimentaire, accumulation de pigments, modification de l'expression de transgènes...) [294, 313, 314] ont considéré ces aspects uniquement à l'échelle globale d'une population; seules quelques études récentes ont commencé à examiner la variabilité inter-individus et l'intégrité d'animaux âgés [30, 294, 315].

Il a été mis en évidence que les différents tissus de l'animal ne sont pas affectés avec la même intensité au cours du vieillissement: chez les nématodes âgés, le système nerveux semble demeurer intact et ne souffrir d'aucune mort neuronale; parallèlement, une sarcopénie (perte progressive de la masse et de la fonction musculaires) comparable à celle observée chez l'Homme âgé, accompagne une diminution de la locomotion suivie d'une perte totale de mobilité chez ces mêmes individus [30]. Mais surtout, il s'est avéré que l'apparition et la progression de ces phénotypes variaient d'un animal à l'autre, des hétérogénéités cellulaires pouvant également survenir au sein d'un même tissu. De plus, seulement quelques uns de ces phénotypes ont pu être supprimés ou retardés par des mutations de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, suggérant qu'ils échappent, pour la plupart, à la régulation génétique du vieillissement. Par

conséquent, leurs travaux ont confirmé la participation concomitante de facteurs génétiques et stochastiques dans les phénotypes de déclin physique liés à l'âge chez *C. elegans*. Les auteurs expliquent les variations entre animaux et le déclin cellulaire au sein d'un même tissu par des dommages aléatoires, et rapprochent cet argument de la théorie du vieillissement de Kirkwood (voir paragraphe I. 2. 2. 3.).

La gradation d'intensité des phénotypes liés à l'âge, ayant permis de prédire plus efficacement l'espérance de vie de chaque animal observé, que l'âge de l'individu lui-même, ils sont désormais considérés comme des marqueurs de vieillissement.

Golden *et al.* ont rapporté une perte de l'intégrité nucléaire au cours du vieillissement des animaux, ainsi qu'une augmentation du nombre de copies du génome (comparé à celui attendu pour un jeune adulte, en tenant compte de la ploïdie des différents types cellulaires). De plus, ils ont montré pour la première fois que ces changements nucléaire et génomique étaient hétérogènes au sein d'une population génétiquement identique [315].

D'autre part, alors que des études se sont focalisées sur la variabilité de l'expression de gènes lors du vieillissement à l'échelle d'une population [316, 317], des expériences de microarrays ont été réalisées afin de définir le profil d'expression de gènes à l'échelle individuelle [318, 319] (Golden *et al.*, en préparation) et ont permis d'établir les conditions expérimentales optimales (taille de l'échantillon, cinétique d'observation, tests statistiques utilisés...) pour espérer identifier des gènes présentant des variations d'ordre stochastique lors du vieillissement [294, 320].

Les effets stochastiques mis en évidence par Herndon *et al.* et Golden *et al.* peuvent être attribués à une source externe, telle que des modifications environnementales, ou interne, telle que l'accumulation de mutations somatiques. Il a d'ailleurs été montré que des mutations dans l'ADN mitochondrial s'accumulaient au cours du vieillissement de *C. elegans* [321, 322]. Par nature, ces mutations somatiques sont stochastiques et chaque individu accumule une « constellation » unique de mutations mitochondriales, une des caractéristiques de la théorie oxydative du vieillissement. Il se pourrait donc qu'elles contribuent à l'hétérogénéité qui existe entre individus âgés d'une même population [323].

L'identification des facteurs aléatoires ou stochastiques influençant la durée de vie au niveau individuel constitue un aspect très intéressant qui demeure cependant largement inexploré. La détermination de l'origine des variations inter-individuelles contribuerait à une meilleure compréhension du processus de vieillissement et fournirait davantage de marqueurs renseignant sur l'espérance de vie, non seulement de *C. elegans* mais aussi d'autres organismes, y compris l'Homme.

Pour résumer, *C. elegans* constitue un excellent système modèle de recherche sur le vieillissement, entre autres, en raison de son cycle de vie court, mais surtout grâce aux possibilités quasi illimitées qu'il offre en matière de génétique moléculaire. De plus, l'existence de mutants à la longévité extrême constitue un outil de choix pour l'étude de la biochimie et de la physiologie du vieillissement.

Malgré son éloignement phylogénique par rapport à l'Homme, *C. elegans* demeure à ce jour un outil de choix pour l'analyse génétique de la longévité [78]. De plus, cet organisme possède la capacité d'adapter son métabolisme en fonction des changements environnementaux et module ainsi profondément sa longévité. De nombreuses études s'attachent à démêler le réseau des voies de signalisation mises en jeu dans cette adaptation et soulignent l'intervention primordiale des voies de défenses contre le stress. La voie DAF-2/Ins/IGF-1 constitue un exemple majeur de la connexion entre régulation de la longévité et régulation de la résistance au stress à travers ses nombreuses cibles, y compris leur expression spatiale et temporelle.

Bien qu'il soit possible de provoquer une extension spectaculaire de la durée de vie de *C. elegans* en combinant des interventions génétiques et environnementales [324], une ultime question persiste : pourquoi les mutants « longue vie » finissent-ils par mourir ? A ce jour, la cause de la mort de *C. elegans* demeure inconnue ; bien qu'une infection bactérienne par *E. coli* (qui constitue leur alimentation) ait été suggérée comme responsable du décès des animaux [294], d'autres études n'ont rapporté aucune preuve confortant cette proposition.

Est-il possible de forcer la maintenance et la réparation cellulaire au delà de la limite observée jusqu'à présent afin d'enrayer les mécanismes de sénescence ? Le rêve de beaucoup de biogérontologues est probablement de « saisir » le processus de vieillissement avant qu'il ne les rattrape eux-mêmes.

III. Les protéines 14-3-3.

III. 1. Généralités.

Les membres de la famille des protéines 14-3-3 forment un groupe de protéines très conservées chez tous les eucaryotes, des plantes jusqu'à l'Homme. Ce sont des protéines acides de faible poids moléculaire (environ 30kDa) dépourvues d'activité enzymatique. Elles ont été mises en évidence lors d'une étude des protéines acides du cerveau de mammifères. Leur nom fait référence à leur fraction d'éluion lors de leur identification par chromatographie sur DEAE-cellulose et à leur position de migration sur gel 2-D [325, 326].

Elles sont exprimées de façon ubiquitaire chez la plupart des eucaryotes et sont majoritairement localisées dans le cytoplasme [327, 328] mais elles sont aussi retrouvées dans le noyau, à la membrane plasmique et au niveau de l'appareil de Golgi.

Le nombre de gènes codant pour des protéines 14-3-3 identifié chez les eucaryotes varie de deux chez *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster* à sept chez les mammifères (α , β , γ , η , σ , ζ et θ) et jusqu'à treize chez *A. thaliana* [329].

Ces différentes protéines s'assemblent en homodimères ou hétérodimères et interagissent avec diverses protéines cellulaires. Chaque monomère se compose d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal variables, séparés par une région centrale amphipathique, riche en hélices α , très conservée. Cette région à la structure très rigide confère à chaque monomère une forme en « L » peu déformable. La dimérisation se fait par l'intermédiaire des extrémités N-terminales de chaque monomère [330, 331] (**Figure 15**) et le dimère formé présente une structure caractéristique en « U » avec une surface interne constante et une surface externe variable [332]. Il peut alors se lier simultanément à deux partenaires identiques ou différents, ou interagir avec deux domaines distincts d'une même protéine.

La spécificité d'interaction des différentes protéines 14-3-3 avec leurs multiples cibles implique les différentes combinaisons d'assemblage de sous-unités possibles, et donc la surface externe du dimère formé [330, 331, 333, 334] qui confère une affinité variable pour les différentes cibles [335] et contribue de façon significative aux multiples effets biologiques exercés par les protéines 14-3-3. Malgré cette spécificité, il semblerait que les différents isotypes de protéines 14-3-3 possèdent également des fonctions redondantes, comme en témoigne l'absence de phénotype lors de la délétion d'un seul des deux gènes 14-3-3 chez la levure, alors que la suppression simultanée des deux protéines est létale [336].

La liaison des différents dimères de 14-3-3 dépend principalement de la présence chez leurs cibles de motifs consensus phosphorylés sur des résidus sérine ou thréonine. Ces motifs

spécifiques sont de type RSXpSXP ou RXXXpSXP où pS correspond à la sérine phosphorylée (pouvant être remplacée par une phosphothréonine), flanquée d'un acide aminé quelconque (X), d'une arginine (R) ou d'une proline (P) [337-340], la présence de deux motifs phosphorylés augmentant l'affinité du dimère pour sa cible ; cependant, les dimères peuvent également se fixer sur certaines protéines sans ce pré-requis [341-344].

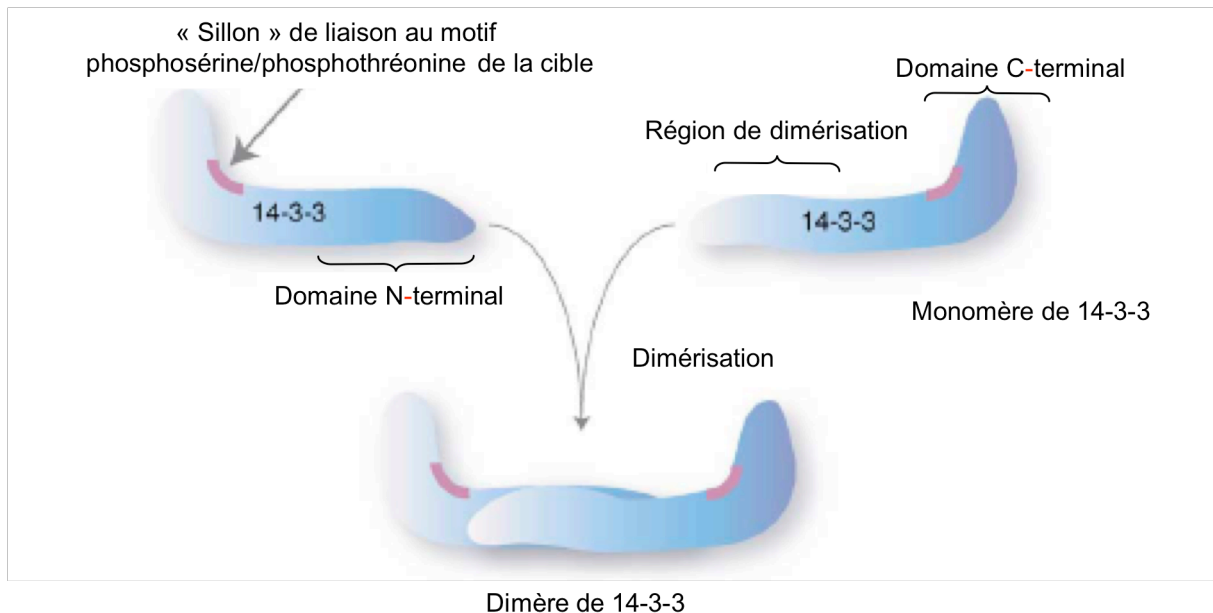


Figure 15: Dimérisation des protéines 14-3-3.

Chaque monomère de 14-3-3 est un polypeptide d'environ 250 acides aminés. Le « sillon » de liaison à la cible phosphorylée, coloré en violet et la région de dimérisation en position N-terminale sont deux domaines relativement conservés entre les différentes protéines 14-3-3. La structure centrale riche en hélices alpha constitue une partie rigide qui permet à chaque protéine de conserver sa forme en « L » et par conséquent de générer un dimère en forme « U » peu déformable. (D'après [335]).

III. 2. Mécanismes d'action des protéines 14-3-3.

Les dimères de protéines 14-3-3 constituent des adaptateurs moléculaires qui peuvent réguler la fonction de leurs cibles en modulant leur activité, leur capacité d'interaction avec d'autres protéines ou en modifiant leur distribution subcellulaire ; ces régulations se font par plusieurs mécanismes [345, 346] (**Figure 16**).

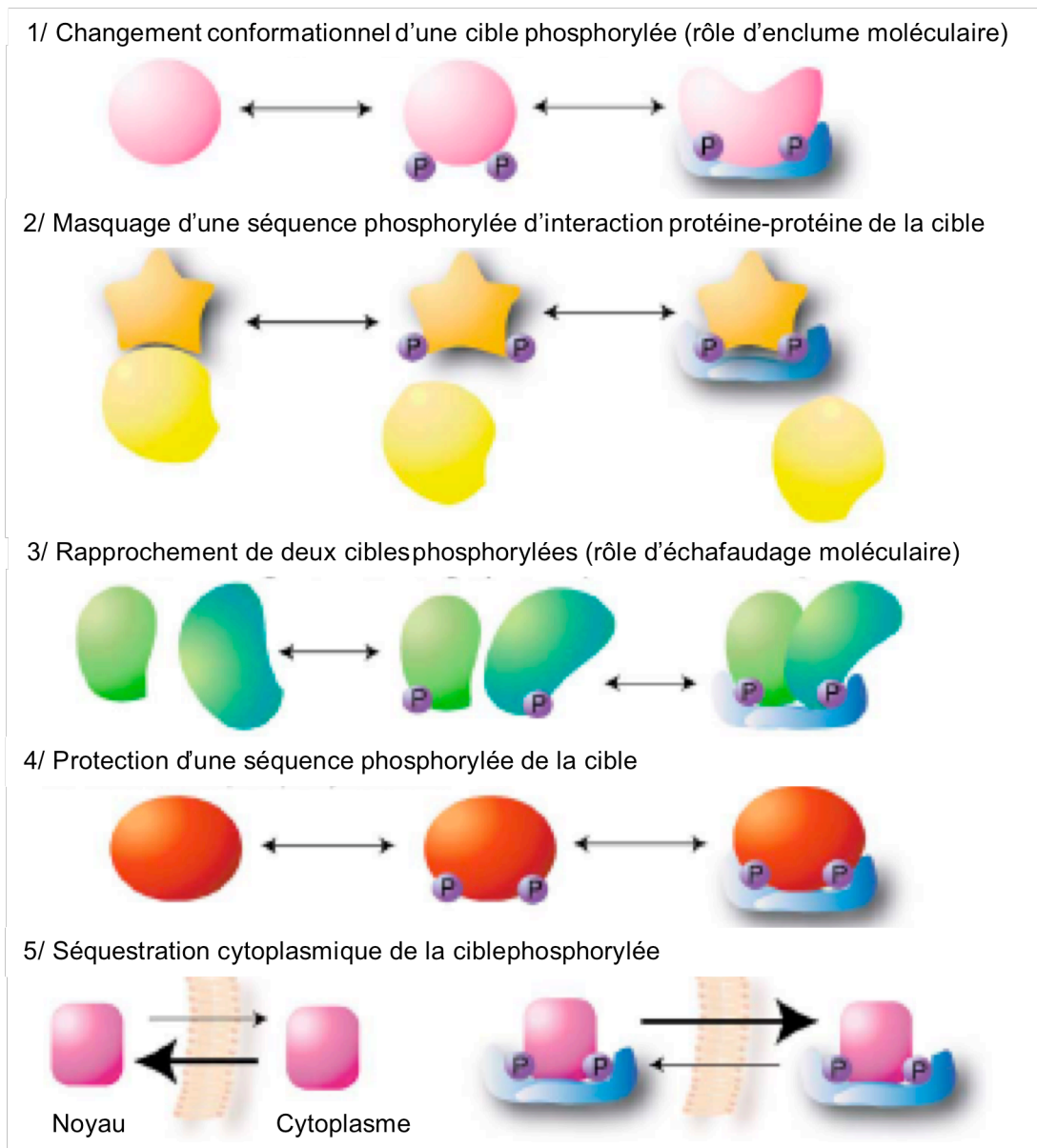


Figure 16: Mécanismes d'action des protéines 14-3-3.

1/ Changements conformationnels de la protéine cible: le dimère de protéines 14-3-3 a une structure rigide et peut donc servir de support pour déformer son partenaire et altérer son activité (augmentation ou diminution).

2/ Masquage d'une séquence phosphorylée de la cible pour empêcher son interaction avec une autre protéine.

3/ Rapprochement de deux cibles phosphorylées. Les protéines 14-3-3 facilitent et stabilisent l'interaction entre deux protéines en jouant un rôle d'échafaudage moléculaire.

4/ Protection d'une cible phosphorylée. Dans cette situation, le dimère de protéines 14-3-3 se lie à sa cible et empêche sa déphosphorylation ou sa protéolyse.

5/ Séquestration cytoplasmique. La liaison d'un dimère de protéine 14-3-3 influence la distribution nucléo-cytoplasmique de sa cible en la modifiant de telle sorte que sa séquence d'export nucléaire soit mise en évidence ou en masquant sa séquence d'import nucléaire. (D'après [335]).

Les protéines 14-3-3 peuvent activer ou inhiber l'activité catalytique d'enzymes par un changement conformationnel. En raison de sa structure rigide, le dimère agit comme une « enclume moléculaire » peu déformable mais capable de modifier la conformation de sa cible. Cette fonction s'applique par exemple à ASK1, une MAP kinase kinase kinase, dont la conformation, une fois liée à un dimère de 14-3-3, ne lui permet plus de transmettre le signal pro-inflammatoire de la cytokine TNF- α [347].

La liaison des protéines 14-3-3 à leur cible peut altérer sa capacité d'interaction avec d'autres protéines en masquant un motif phosphorylé. C'est le cas de la protéine IRS-1 (« Insulin receptor substrate-1 ») et de la Phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) : la liaison d'un dimère de 14-3-3 à IRS-1 diminue sa capacité à recruter et activer la PI3K [348].

Les protéines 14-3-3 peuvent également permettre l'interaction de deux protéines cibles et servir ainsi « d'échafaudage moléculaire ». Cette fonction est mise en œuvre *in cellulo* dans le rapprochement de la protéine kinase C zeta (PKC ζ) et de la protéine codée par le proto-oncogène Raf, qui peut ainsi être activée [349] et dans celui de la déacétylase SIR-2.1 et du facteur de transcription DAF-16 chez *C. elegans* qui forment ainsi un complexe activant des gènes de réponse au stress [89].

L'interaction des protéines 14-3-3 avec leurs partenaires peut aussi avoir pour fonction de les préserver d'une déphosphorylation et de la protéolyse. Chez les plantes, les protéines 14-3-3 régulent notamment la stabilité de la nitrate réductase, une enzyme impliquée dans un mécanisme essentiel et des plus rapides permettant à la plante de survivre à des changements de lumière très brefs [350].

Enfin, l'interaction d'un dimère de protéines 14-3-3 avec son partenaire peut modifier la localisation subcellulaire de celui-ci [343]. Le dimère masque la séquence signal de sa cible et l'empêche d'atteindre son site d'action. Plusieurs exemples d'exclusion nucléaire de protéines suivie de leur rétention cytoplasmique illustrent ce mode d'action : la protéine 14-3-3 Rad24 contrôle la distribution intracellulaire de la phosphatase Cdc25C, et de la kinase Chk1, impliquées dans le cycle cellulaire, et participe ainsi à la régulation d'un point de contrôle de mitose [351-353]. De la même façon, les protéines 14-3-3 participent à l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription de la famille Forkhead *in cellulo*, FKHL1 pour les mammifères et DAF-16 pour *C. elegans*, en les séquestrant dans le cytoplasme [354, 355].

Les différentes fonctions des protéines 14-3-3 leur permettent donc de réguler activement le rôle de leurs cibles, d'autant plus qu'elles peuvent exercer plusieurs modes d'action sur un seul et même partenaire pour influencer sa fonction.

III. 3. Cibles des protéines 14-3-3.

D'après des études de protéomique, les protéines 14-3-3 peuvent se lier à plus de deux cents partenaires différents [356-359]. Certains sont bien décrits tels que les kinases Raf-1, ASK1, et PKC, les facteurs de transcription FKHRL1, DAF-16 et p53, la phosphatase Cdc25C et les protéines pro-et anti-apoptotiques BAD et A20, pour n'en citer que quelques uns [360, 361].

En raison de la variété de leurs partenaires, les protéines 14-3-3 sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires primordiaux, tels que le cycle cellulaire, les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, le métabolisme, la transduction du signal, l'apoptose, le trafic intracellulaire, la régulation transcriptionnelle et les réarrangements du cytosquelette [362, 363], qu'elles régulent à plusieurs niveaux. Les modes d'action qu'utilisent les protéines 14-3-3 pour réguler spécifiquement leurs nombreuses cibles, font d'elles des interacteurs idéaux pour une modulation fine de ces processus.

III. 4. Régulation des protéines 14-3-3.

Peu d'études ont été menées sur la régulation des protéines 14-3-3 elles-mêmes. Il a été rapporté qu'elles subiraient des phosphorylations chez les plantes, la levure et les mammifères [364-368] et que cette modification altérerait leur capacité de dimérisation et de liaison à leurs cibles. Seulement certaines kinases responsables de ces phosphorylations ont été identifiées : par exemple, la caséine kinase phosphoryle 14-3-3 β et ζ , dans le cerveau de mammifères, diminuant leur liaison à leur cible c-Raf [366] ; JNK phosphoryle 14-3-3 ζ *in cellulo*, et permet ainsi la libération des protéines pro-apoptotiques BAX et BAD [369] ; la MAPKAP kinase 2 phosphoryle la protéine 14-3-3 ζ *in cellulo* perturbant de cette façon sa dimérisation [370]. Cependant, aucun des sites de phosphorylation mis en évidence ne semble conservé d'une protéine 14-3-3 à l'autre, ce qui laisse à penser que leur spécificité et leur hétérodimérisation jouent un rôle important dans leur phosphorylation.

Outre la régulation par phosphorylation de leur activité de dimérisation et de liaison à leurs cibles, la disponibilité des protéines 14-3-3 au sein de la cellule peut être influencée par certaines de leurs cibles elles-mêmes. Par exemple, il a été montré, que les filaments intermédiaires de vimentine et de kératine pouvaient contribuer à la séquestration des protéines 14-3-3, limitant ainsi leur disponibilité pour interagir avec d'autres partenaires [371, 372].

Enfin, peu de choses sont connues du mécanisme de régulation de leur expression. Cependant, une altération du niveau d'expression des protéines 14-3-3 a été rapportée dans des maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie de Creutzfeldt Jacob, d'Alzheimer et de Parkinson [373] et dans différents cancers [374, 375]. Etant donnée, d'une part, l'abondance des protéines 14-3-3 dans le cerveau des mammifères et d'autre part, leur interaction avec des cibles aux propriétés pro- (Ras, Bcr-Abl...) et anti-oncogéniques (p53, Forkhead...) ou impliquées dans l'adhérence cellulaire (intégrines) [376], de nombreuses études sont conduites dans le but de préciser le rôle des protéines 14-3-3 dans les pathologies humaines et de les identifier en tant que cibles thérapeutiques potentielles [377, 378].

Une connaissance plus précise de la régulation des protéines 14-3-3 ainsi que des kinases et phosphatases qui modulent la phosphorylation des motifs de liaison de leurs cibles contribuera certainement à éclaircir l'implication de ces protéines dans les multiples processus physiologiques et pathologiques.

III. 5. Les protéines 14-3-3 chez *C. elegans*.

III. 5. 1. Généralités.

Deux gènes, *ftt-1* et *ftt-2* (*fit* pour « *fourteen-three-three* ») codant pour deux protéines 14-3-3 de 248 acides aminés, identiques à environ 80% à la protéine humaine 14-3-3 ζ ont été identifiés chez *C. elegans* [379]. Ces deux gènes partagent 78,2% d'identité tandis que les protéines correspondantes présentent 85,9% d'identité.

Malgré cela, les deux gènes présentent des différences importantes au niveau de leur structure génomique et de leur profil d'expression [380]. Bien que tous deux constitués de quatre exons et de trois introns, les gènes *ftt-1* et *ftt-2* diffèrent au niveau de la taille et de la position des introns qui ne respectent pas la délimitation correspondant aux différents domaines fonctionnels des protéines. De plus, il n'existe que très peu ou pas de similarité de séquence entre les introns des deux gènes, ni entre les régions 5' et 3' non codantes qui les encadrent.

Le gène *ftt-1*, localisé sur le chromosome IV, code pour trois transcrits de tailles différentes (0,9kb, 1,35kb et 1,5kb), dont le plus abondant est celui de 0,9kb.

Le gène *ftt-2*, situé sur le chromosome X, code pour un seul transcrit de 1,4kb.

Alors que l'expression des quatre transcrits est abondante dans les embryons, elle diminue lors de la progression à travers les stades larvaires pour se stabiliser au stade adulte (**Figure 17**), suggérant que les deux gènes sont régulés pendant le développement.

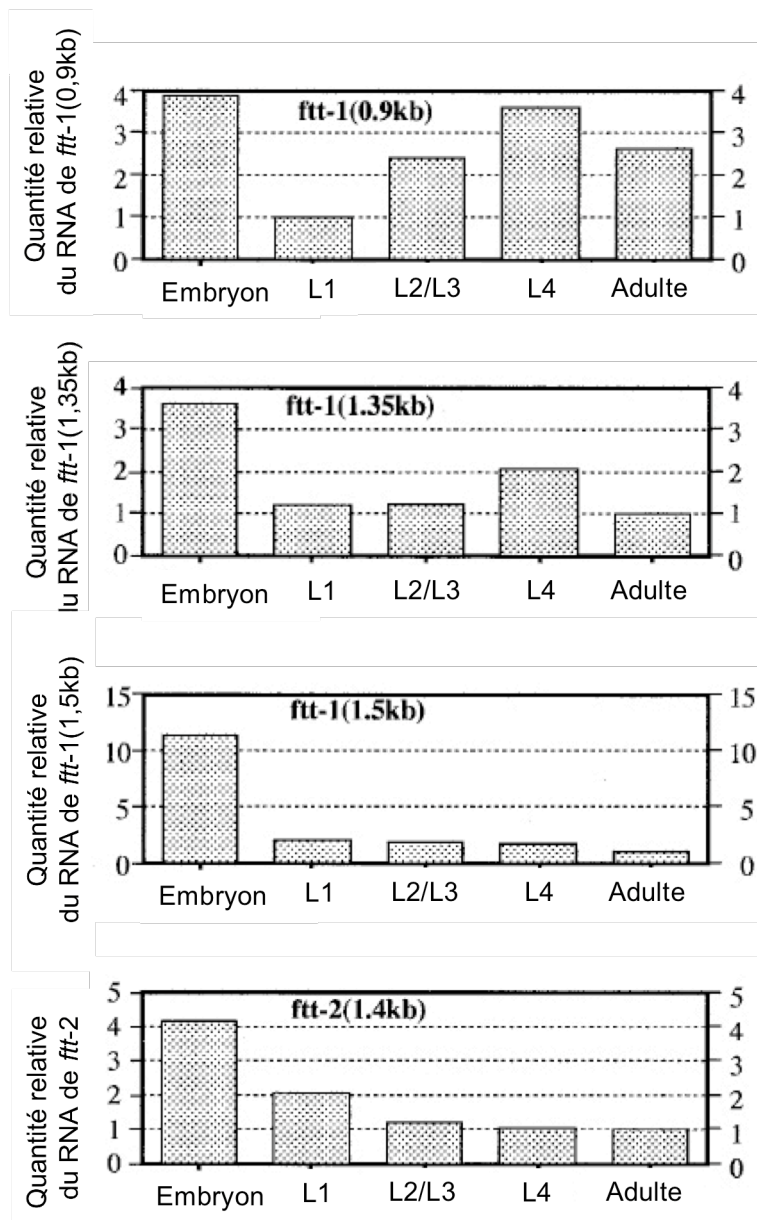


Figure 17: Profils d'expression des gènes *ftt-1* et *ftt-2* pendant les différents stades de développement et le stade adulte. L'ARN total d'embryons, de larves L1, L2/L3, L4 et de vers adultes a été extrait et utilisé pour réaliser des «Northern blot». L'abondance relative de chacun des transcripts a été déterminée par quantification du signal sur films autoradiographiques. Les résultats ont été convertis en histogrammes après normalisation par rapport à la quantité d'ARN ribosomique 28S. Le niveau le plus bas de chaque transcript a été arbitrairement fixé à 1 pour faciliter la comparaison de l'expression d'un même transcript lors des différents stades. (D'après [380]).

Alors que l'expression de *ftt-2* est strictement somatique, *ftt-1* est un gène à effet maternel essentiellement exprimé chez l'embryon et dans les cellules germinales des animaux adultes. *ftt-1* est aussi appelé *par-5* car, parallèlement, il a été mis en évidence avec les protéines de la

famille PAR [381, 382] en tant qu'acteur de la polarisation antéro-postérieure du zygote et de la polarisation baso-apicale de différents types cellulaires lors de l'embryogénèse précoce [383]. Dans ces processus, FTT-1/PAR-5 régule la distribution asymétrique des autres protéines PAR et il s'agit de la première protéine 14-3-3 impliquée dans la détermination de la polarité antéro-postérieure d'une cellule.

Après une caractérisation des profils d'expression de *ftt-1* et de *ftt-2* par une quantification de leur niveau total d'ARN messager et des expériences d'hybridation *in situ* [380], des animaux transgéniques exprimant les protéines FTT-1 et FTT-2 étiquetées avec une GFP ont été réalisés et ont permis une visualisation plus fine des tissus d'expression des deux protéines [384]. Une expression importante de PAR-5 ::GFP a été observée dans plusieurs neurones de la tête, dans l'intestin et au niveau de la corde nerveuse ventrale, tandis que la construction FTT-2 ::GFP s'exprime fortement dans le pharynx, dans les neurones de la tête, du corps et de la queue et faiblement dans l'intestin (**Figure 18**). Les résultats concernant les tissus d'expression de *ftt-1* ne sont que partiellement en accord avec les données d'hybridation *in situ*, ces différences pouvant être attribuées à l'expression exogène du transgène FTT-1 ::GFP.

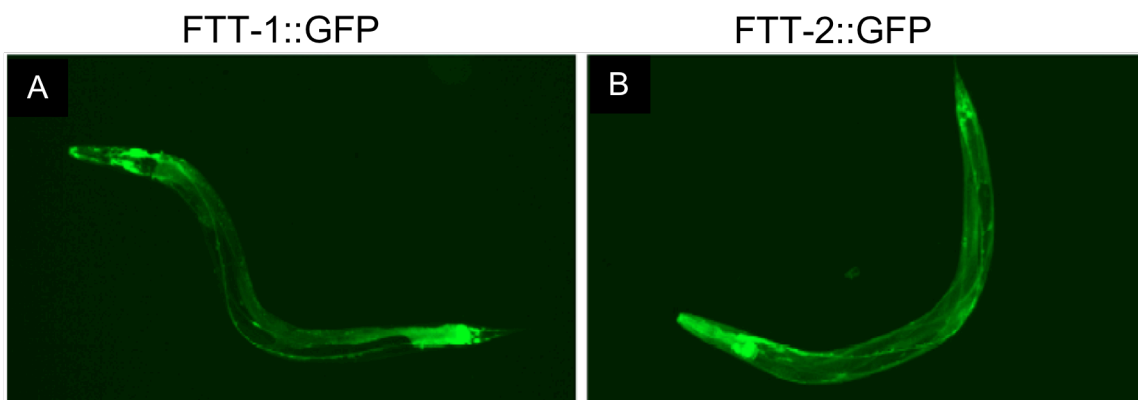


Figure 18: Expression de FTT-1::GFP et FTT-2::GFP chez des vers adultes dans des conditions de culture classique. (A). FTT-1::GFP s'exprime fortement dans le système nerveux et au niveau de l'intestin. (B). FTT-2::GFP s'exprime de façon marquée au niveau du pharynx et du système nerveux et plus faiblement au niveau de l'intestin. (D'après [380]).

III. 5. 2. Implication de FTT-1 et FTT-2 dans la régulation de la longévité, de la résistance au stress et de la formation des larves dauers.

Trois articles seulement sont parus sur l'implication des protéines FTT dans la régulation de la longévité et des phénotypes associés à l'activité du facteur de transcription DAF-16 [295, 384, 385].

Il a été montré que la surexpression de la déacétylase SIR-2.1 entraînait une extension de longévité chez *C. elegans* et que ce phénotype dépendait du facteur de transcription DAF-16 [120]. Se basant sur ce résultat et sur l'interaction biochimique des protéines 14-3-3 de mammifères avec DAF-16 *in vitro* et *in cellulo* [354, 386], deux d'entre eux se sont plus précisément intéressés à la régulation de la longévité impliquant à la fois les protéines FTT, DAF-16 et SIR-2.1. Si les résultats rapportés par ces trois groupes concordent dans l'ensemble, des divergences apparaissent néanmoins, probablement en raison de l'utilisation d'outils RNAi différents.

III. 5. 2. 1. Interaction des protéines FTT avec DAF-16 et SIR-2.1 et localisation subcellulaire de DAF-16 par les protéines FTT-1 et FTT-2.

Des études de surexpression et de délétion du gène codant pour la déacétylase SIR-2.1 ont suggéré un rôle complexe de cette protéine dans la régulation de la longévité de façon dépendante et indépendante de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. D'une part, une surexpression de *sir-2.1* entraîne une augmentation de la durée de vie des animaux de façon dépendante de DAF-16 [120]. D'autre part, l'extension de longévité des animaux soumis à une DR, connue pour être indépendante de DAF-16 [105], est supprimée par une délétion de *sir-2.1* [121]. Se basant sur ces données et sur le fait que les protéines 14-3-3 de mammifères régulent la localisation de DAF-16 *in cellulo*, le groupe de Heidi Tissenbaum a voulu caractériser les liens unissant ces trois protéines. Grâce à des cribles de double hybride chez la levure et des expériences d'immuno-précipitation chez *C. elegans*, il a pu être mis en évidence, pour la première fois, que FTT-1 et FTT-2 interagissent avec DAF-16 et SIR-2.1 *in vivo* [384], résultats confirmés par la suite par Berdichevsky *et al.* [295]. Parallèlement, il a été montré que FTT-1 et FTT-2 sont responsables de la rétention cytoplasmique de DAF-16, et présentent une distribution à la fois nucléaire et cytoplasmique, confirmant la conservation du mécanisme de « va-et-vient » nucléo-cytoplasmique pour réguler la localisation des facteurs de transcription de la famille Forkhead chez les mammifères [387]. Ce résultat n'a cependant

pas été observé par Li *et al.* dans le cas de FTT-1 [385]. Cette contradiction peut s'expliquer par l'utilisation d'outils différents pour le RNAi feeding.

De plus, les protéines FTT contribuent à la localisation nucléaire de DAF-16 chez des individus surexprimant *sir-2.1* et sont de ce fait requises dans l'extension de la longévité de ces animaux.

III. 5. 2. 2. Régulation de la longévité et de la résistance au stress par FTT-1 et FTT-2.

Il a été rapporté qu'une surexpression de *ftt-1* ou de *ftt-2* augmente la longévité des animaux, de la même façon qu'une surexpression de *sir-2.1*, qui est dépendante de DAF-16, ou qu'une surexpression de *daf-16* [275].

Pourtant, alors que les protéines FTT séquestrent DAF-16 dans le cytoplasme, un traitement RNAi contre *ftt-1* ou *ftt-2* n'augmente pas la longévité mais au contraire la diminue [295] (Li *et al.* ont aussi rapporté cet effet pour le RNAi *ftt-2* mais n'ont observé aucune variation de longévité dans le cas du RNAi *ftt-1* [385]), ce qui suggère que la localisation nucléaire de DAF-16 ne suffit pas à activer ses gènes cibles et à étendre la durée de vie des animaux.

D'autre part, ce même traitement n'entraîne aucun effet sur le gain de longévité des mutants *daf-2*, suggérant que FTT-1 et FTT-2 ne fonctionnent pas dans la voie DAF-2/Ins/IGF-1 pour réguler la longévité [295, 384, 385].

FTT-1 et FTT-2, en plus de contribuer à leur phénotype « longue vie », sont impliquées dans la résistance au stress des vers surexprimant *sir-2.1*. Des expériences de microarrays ont montré qu'une surexpression de *sir-2.1* induit l'expression de différentes cibles transcriptionnelles de DAF-16 [122]; il a ensuite été précisé qu'une surexpression de *sir-2.1* requiert la contribution des protéines FTT pour stimuler l'activité transcriptionnelle de DAF-16. De plus, suite à un stress thermique, SIR-2.1 interagit avec DAF-16 grâce au concours des protéines FTT.

Sur la base de ces résultats, un modèle a été proposé (**Figure 19**) selon lequel les protéines FTT et SIR-2.1 interagissent dans la régulation de la longévité dans des conditions de stress.

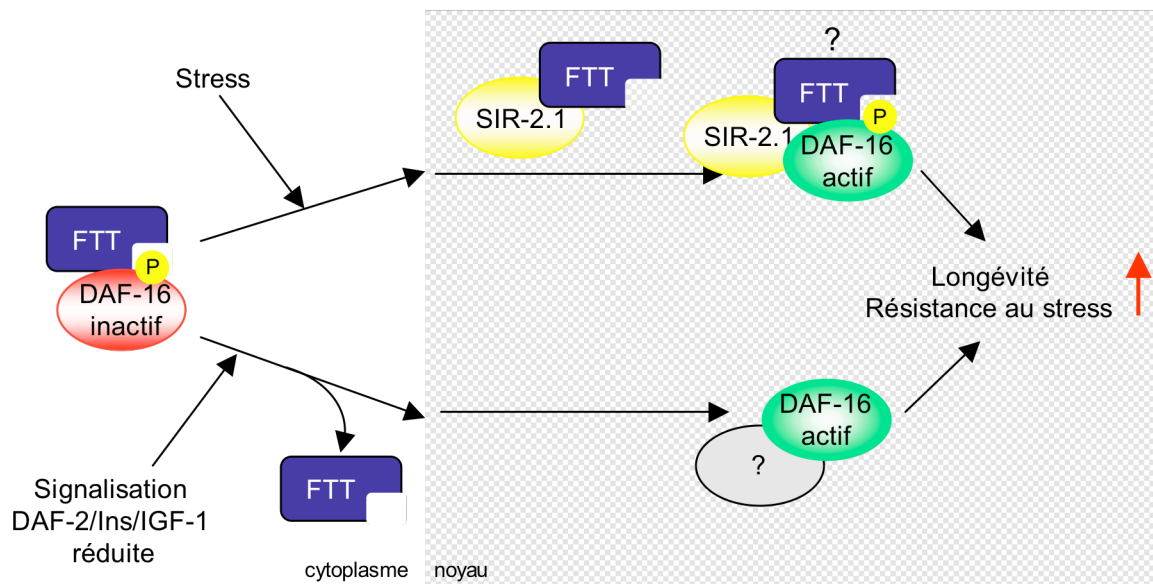


Figure 19: modèle pour le rôle de SIR-2.1 et des protéines FTT dans la régulation de la longévité et de la résistance au stress, dépendantes de DAF-16.

Il existerait deux types de complexes impliquant les protéines FTT: le complexe FTT/DAF-16, localisé dans le cytoplasme et le complexe FTT/SIR-2.1 localisé dans le noyau. Suite à un stress, DAF-16 transloquerait dans le noyau où il pourrait être lié par SIR-2.1 par l'intermédiaire des protéines FTT. Le complexe ternaire obtenu participerait à l'activation de la transcription des gènes cibles de DAF-16.

Lorsque la signalisation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 est réduite, DAF-16 n'étant plus phosphorylé par AKT, il se dissocierait des protéines FTT et s'accumulerait dans le noyau. Dans ces conditions, il ne nécessiterait ni la liaison à SIR-2.1, ni aux protéines FTT pour activer la transcription de ses gènes cibles et promouvoir la longévité et la résistance au stress des animaux. Il est possible qu'un autre co-facteur nucléaire stimule l'activité de DAF-16. (D'après [295]).

III. 5. 2. 3. Régulation de l'entrée en dauer par FTT-1 et FTT-2.

Un seul groupe s'est intéressé à l'implication des protéines FTT dans la formation des larves dauers [385]. Pour cela, des expériences de RNAi contre l'un ou l'autre des gènes *ftt* ont été réalisées sur des mutants *daf-2* hypomorphes, fond génétique adapté à la mise en évidence de ce phénotype. 72 heures après l'éclosion des œufs, le traitement RNAi contrôle conduit à la formation de 100% de larves dauers qui finissent par sortir de ce stade larvaire 24 heures plus tard, et poursuivent leur développement jusqu'au stade adulte. Le RNAi contre *ftt-2* entraîne également la formation de 100% de larves dauers avec la même cinétique, à la différence près que la majorité d'entre elles ne sont toujours pas sorties de ce stade alternatif jusqu'à 168h après leur formation. En revanche, le RNAi *ftt-1* a le même effet que le RNAi

contrôle. Ainsi, seul FTT-2 interagit avec la voie DAF-2/Ins/IGF-1 pour affecter la formation des larves dauer par une régulation négative [385].

Les résultats de Wang *et al.*, Berdichevsky *et al.* et Li *et al.*, bien que ne se recoupant pas systématiquement, permettent de dégager le consensus suivant: malgré leur forte identité, FTT-1 et FTT-2 possèdent des fonctions biologiques distinctes, un rôle prépondérant étant attribué à FTT-2 dans la régulation de la longévité et de la résistance au stress.

RÉSULTATS

Publication 1

14-3-3 regulates life span by both DAF-16-dependent and –independent mechanisms in *Caenorhabditis elegans*

Caroline Araiz ^a, Marie-Thérèse Château ^{a,b}, Simon Galas ^{a,b}

^a CRBM-CNRS, 1919 route de Mende, F34293 Montpellier cedex 5, France

^b Université Montpellier1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, B.P. 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

Lorsque j'ai initié le projet concernant la régulation de la longévité par les protéines 14-3-3 chez *C. elegans*, peu de choses étaient connues à leur sujet. Deux gènes, *ftt-1* et *ftt-2* avaient été identifiés [379], le premier correspondant à *par-5*, gène à effet maternel, exprimé essentiellement chez l'embryon et dans les cellules germinales du ver adulte et impliqué dans la polarisation embryonnaire [383] et le second exprimé exclusivement dans les cellules somatiques, sans fonction précise rapportée [380].

Il était connu que les protéines 14-3-3 régulaient la localisation subcellulaire des facteurs de transcription de la famille Forkhead *in cellulo* [355, 388, 389]. D'autre part, des expériences conduites *in vitro* [390], avaient rapporté que le facteur de transcription DAF-16 de *C. elegans*, orthologue de Forkhead chez les mammifères, était phosphorylé par la kinase AKT sur des sites de liaison des protéines 14-3-3 et que suite à sa prise en charge par un dimère de 14-3-3 de mammifères, DAF-16 ne pouvait plus se lier à l'ADN. Cahill *et al.* avaient montré *in cellulo* que la phosphorylation de DAF-16 par AKT entraînait non seulement sa liaison par les protéines 14-3-3 mais provoquait également son exclusion du noyau [354].

Enfin, il était connu que la longévité de *C. elegans* était contrôlée majoritairement par la voie DAF-2/Ins/IGF-1, composée du récepteur DAF-2, relayé par une série de kinases et de son effecteur principal, le facteur de transcription DAF-16 [19].

C'est dans ce contexte que je me suis intéressée à la caractérisation *in vivo* de la régulation, par les deux protéines 14-3-3 de *C. elegans*, FTT-1 et FTT-2, de la longévité médiée par DAF-16.

Par ailleurs, l'observation d'un phénotype létal suite à la délétion de l'un ou l'autre des deux gènes [383], suggérant leur implication dans des fonctions biologiques distinctes et essentielles, l'objectif du projet a été de déterminer les fonctions respectives de FTT-1 et FTT-2 dans cette régulation.



14-3-3 regulates life span by both DAF-16-dependent and -independent mechanisms in *Caenorhabditis elegans*

Caroline Araiz^a, Marie-Thérèse Château^{a,b}, Simon Galas^{a,b,*}

^aCRBM-CNRS, 1919 route de Mende, F34293 Montpellier cedex 5, France

^bUniversité Montpellier1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, B.P. 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2007

Received in revised form 13 February 2008

Accepted 4 March 2008

Available online 18 March 2008

Keywords:

C. elegans

Ageing

Insulin/IGF-1/DAF-2

FOXO/DAF-16

14-3-3/*ftt1*/*ftt2*

ABSTRACT

Caenorhabditis elegans life span, stress resistance and metabolism are regulated by the Insulin/IGF-1/DAF-2/DAF-16 pathway. DAF-16, a member of FOXO/Forkhead transcription factor family, can be targeted by 14-3-3 proteins to promote stress resistance. We have identified a 14-3-3 *C. elegans* homolog which promotes life span by both DAF-2-dependent and -independent mechanisms and by an unexpected DAF-16-independent mechanism. Our results demonstrate that *C. elegans* 14-3-3 proteins modulate stress-responsive genes throughout adulthood. In conclusion, 14-3-3 can be considered as an acute stress-responsive regulator as well as a sustained modulator of the Insulin/IGF-1/DAF-2/DAF-16 regulatory pathway in promoting life expectancy of growing old worms.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cell regulatory pathways, including signal transduction, apoptosis, stress response and transformation, can be targeted by one or several 14-3-3 gene isoform products in organisms ranging from yeast to human (Van Hemert et al., 2001). The 14-3-3 family members are discrete binding proteins with no intrinsic enzymatic activity. However, the 14-3-3 proteins can act as enzymatic regulators as well as localization anchors or adaptator molecules with scaffold activity that can, in turn, stimulate various protein–protein interactions (Van Hemert et al., 2001). The *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) genome encodes two 14-3-3 genes: *ftt-1* and *ftt-2* (*ftt* for fourteen-three-three; Wang and Shakes, 1994). While a reported simultaneous expression of *ftt-1* and *ftt-2* during early embryogenesis may allow cooperative effects, the divergent expression patterns during pre-reproductive or adulthood stages argue for different respective biological functions (Wang and Shakes, 1997). Thus, while the germline enriched *ftt-1* gene product (Wang and Shakes, 1997) – also known as *par-5* – is involved in the asymmetric cortical localization of other *par* gene products that can, in turn, influence the general asymmetry determinism in early embryos (Morton et al., 2002), the *ftt-2* gene expression pattern is largely non-overlapping with the former because of a re-

ported somatic expression that also takes place at later developmental stages (Wang and Shakes, 1997).

The expression pattern of a specific reporter transgene for *ftt-2* and the *ftt-1* further supports this view (Wang et al., 2006), altogether these reports make the *ftt-2* gene product a *bona fide* candidate for a transduction pathway regulator during post-embryonic or post-developmental stages of *C. elegans*.

Mammalian FOXO homologs are well-known targets of 14-3-3 proteins (Van Hemert et al., 2001; Brunet et al., 1999) but it has been shown that active *C. elegans* DAF-16 transcription factor, a FOXO family transcription factor (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997; Kenyon, 2005), can be inhibited by 14-3-3-dependent and -independent pathways in cell culture (Cahill et al., 2001). The conserved DAF-2/IGF-1 signalling pathway (Kenyon, 2005) is believed to regulate life span through inhibition of the *daf-16* gene product and it has been proposed that differential signalling may originate at the DAF-2/IGF-1 receptor to regulate *daf-16* gene product activity leading to the emergence of different phenotypic *daf-2* allele class mutants (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005). Moreover, the IGF-1 receptor itself, as well as downstream transducers such as 3-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) or IRSs (insulin receptor substrates), are 14-3-3-reported targets (Van Hemert et al., 2001; Craparo et al., 1997; Sato et al., 2002). Recent reports demonstrated a positive worm life span modulation by 14-3-3 through a cooperative interaction mechanism involving both SIR-2.1 and FOXO/DAF-16: a mechanism fully suppressible by a *daf-16* loss-of-function mutation or RNAi inactivation (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006; Li et al., 2007). This new regula-

* Corresponding author. Address: CRBM-CNRS, 1919 route de Mende, F34293 Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 (0)4 67 613432; fax: +33 (0)4 67 521559.

E-mail address: simon.galas@crbm.cnrs.fr (S. Galas).

tory pathway has been linked to a stress-dependent mechanism acting in parallel to the DAF-2/IGF-1 signalling pathway to activate FOXO/DAF-16 and promote life span (Berdichevsky and Guarente, 2006).

This report demonstrates that *C. elegans* 14-3-3 gene products can promote life span by both FOXO/*daf-16*-dependent and -independent mechanisms. Furthermore we also reveal a specific *daf-2* class mutant allele requirement for 14-3-3 genes to promote life span, together with different effects on physiological traits including both thermal and oxidative stress resistance, development, dauer arrest and fat storage. Finally, our work extends *C. elegans* 14-3-3 involvements in biological pathways functioning with acute stress response and sustained life span regulation.

2. Materials and methods

2.1. Strains and worm cultures

Worms were cultured and maintained as described previously (Brenner, 1974). We used the following strains: Wild type Bristol (N2), GR1307 *daf-16(mgDf50)*, CB13710 *daf-2(e1370)*, JT709 *pdk-1(sa709)*, JT9609 *pdk-1(sa680)*, GR1318 *pdk-1(mg142)*, CF1330 *muEx128* [*pKL79 (daf-16a::GFP)+pRF4 rol-6 (su1006)*], CL2070 *dvIs70*, CF1553 *mul84* [*pAD76(sod-3::GFP)*], CL2166 *dvIs19* [*pAF15(gst-4::GFP::NLS)*] which were all provided by the Caenorhabditis Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resources). DR1569 *daf-2(e1365)* was kindly provided by Donald L. Riddle, University of British Columbia, Canada. Unless specified, worms were cultured at 20 or 15 °C for JT709 *pdk-1(sa709)*.

2.2. RNAi constructs

The *ftt-1* RNAi construct was obtained by subcloning a 709 bp HindIII/BglIII fragment from the pCP5 vector into the pPD129.36 (L4440) vector (a generous gift of Johnathan Ewbank, CNRS, Marseille, France) while *ftt-2* RNAi construct was generated by subcloning a 531bp HindIII fragment from the pSE16 vector into the pPD129.36 (L4440) vector. Both pCP5 and pSE16 *ftt* cDNA clones were a generous gift from Diane Shakes (College of William and Mary, Virginia, USA). After transformation with either pPD129.36, *ftt-1* or *ftt-2* RNAi construct, HT115 (DE3) strain bacteria were grown in LB medium with both Ampicillin (50 µg/ml) and Tetracycline (12.5 µg/ml) during 8 h, then seeded on NGM plates containing FUDR (98.5 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml) and IPTG (1 mM) and induced overnight.

2.3. RNAi feeding and life span assays

Adult stage RNAi: L4 larvae fed with RNAi producing bacteria were allowed to grow on NGM plates at 20 °C until they died. To avoid offspring during experiments we used plates with FUDR (Mitchell et al., 1979). Dead worms were scored every day until they were all dead. Vitality was assessed by the animal response to one or several gentle nose touches. Worms that died by scrolling out of agar plates were scored as censored data. XLSTAT-life statistical software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan–Meier method and differences between survival curves were calculated using the LogRank test with 95% confidence.

Developmental stage RNAi and dauer assay: Five to ten L4/young adult hermaphrodites for each strain were permitted to egg-lay for 2 h on plates seeded with transformed HT115 at 22.5 °C. The progeny was then allowed to grow on these same conditions. Delay to reach L4 stage was checked comparing to N2 on control RNAi conditions. All the worms growing to L4/young adult

stage were transferred onto NGM plates with only FUDR and *Escherichia coli* OP50 strain and scored for life span trials, whereas dauer larvae were scored until around 72 h and transferred onto fresh RNAi plates and observed until they left this stage and scored for dauer exit. For statistical analysis of the life span data curves we considered only the trials that gave a high percentage of dauer in parallel.

2.4. Real-time PCR

Synchronised N2 adult worms were transferred on RNAi plates at 20 °C during 1 day and then collected by washing with M9 buffer and pelleted. Total RNA isolation was done using TRIzol Reagent (Invitrogen) and RNA quantification was assessed by both gel electrophoresis and UV-spectrophotometric analysis. cDNAs were synthesized with random hexamers by using Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. Real-time PCRs were performed using LightCycler Fast Start DNA Master^{plus} SYBR Green I kit in capillaries. Triplicates for each sample were included for one single reaction.

The real-time PCR primers for *TBA2* are: Forward primer: 5'-CCTCCTCCGAATGAATGAAA-3'; Reverse primer: 5'-TCCGATACTGGA AACGGAAG-3'. Primers for *ftt-1* are: Forward primer: 5'-GTTT CAGAAGACTTGCTCAC-3'; Reverse primer: 5'-CTCGGTCACCTTCTCA TGGC-3'. Primers for *ftt-2* are: Forward primer: 5'-CAGTGACTCAT CCACTTCAAGC-3'; Reverse primer: 5'-AACGCTCAGCTGCTCGGC AAG-3'. All the PCR products were checked by sequencing. To avoid LightCycler crossamplification of RNA sequence included in RNAi-fed worms, both *ftt-1*- and *ftt-2*-specific forward primers were designed to hybridize the 5'-UTR region not included in the RNAi-targeted sequences. The corresponding reverse primers were designed to hybridize the boundary of the first and the second exons in order to prevent crossamplification of unspliced RNAs. *tba-2* was used as the internal control and the RNA level of each gene of interest was normalized to the *tba-2* level for comparison. Real-time PCRs were performed thrice using independent RNAi worms and RNA isolations and results were treated as described (Pfaffl, 2001). All of quantified PCR products in this study were previously sequenced for molecular identity verification.

2.5. Nile red fat staining and handling of worms for transgene observations

We used Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[alpha]phenoxazine-5-one) obtained from Molecular Probes (N-1142) dissolved with acetone and mixed with transformed HT115 DE3 *E. coli* strain, at a final concentration of 0.5 µg/ml. Five L4/young adult hermaphrodites of each strain were allowed to egg-lay for 2 h at 22.5 °C under RNAi conditions and then removed. The progeny was left on these plates until it reached L4/young adult stage. Nile red treatment resulted in uptake and incorporation of the dye into lipid droplets in intestinal cells, the main site of worm fat storage.

L4/young adults from either CF1553, CL2070 or CL2166 strains were transferred onto NGM plates prepared for RNAi feeding induction with FUDR. After 4 and 18 days of treatment, sample worms were collected and observed under epifluorescence microscope.

2.6. Oxidative and heat-shock stress resistance assays

After 1 week of RNAi treatment at 20 °C adult worms were transferred onto 24-well plates (about 50 worms per well), with 10 mM of Menadione (Sigma–Aldrich) and HT115 bacteria mixed with S complete medium to maintain the RNAi treatment during the assay. Complete S medium mixed with HT115 bacteria was used as a control. Experiments were carried out for 7 days at

20 °C. We scored the number of alive and dead worms each day, using 1 μ M SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Molecular Probes) to discriminate dead worms from alive ones. Survival histograms were analyzed with XLSTAT software (Addinsoft, New York, NY, USA). For heat-shock stress induction, adult worms fed on RNAi seeded plates at 20 °C for 1 week were placed on a 37 °C water bath for 2.5 h then returned to 20 °C and scored for dead worms.

2.7. Microscopy observation and pixel quantification

Microscopy observations were performed on a Zeiss Axiomager.Z1 with a Photometrics CoolSnap HQ2 camera at either 400 \times or 1000 \times magnification with Zeiss Plan Neofluar-1.3 or Zeiss Aplanachromat-1.4 objectives, respectively. Nile red staining was assessed with a Zeiss FS00, BP530-585, FT600, LP615 red filter while GFP signal was assessed with a Zeiss GFP FS38HE, BP470/40, FT495, BPJ25/50 GFP filter. Pixel quantification was performed with Metamorph v7.1 software (Molecular Devices, USA) while data analysis by a Student's *t*-test was done using the XLSTAT software (Addinsoft, New York, NY, USA).

3. Experimental results

3.1. *ftt-2* gene but not *ftt-1* gene modulates life span in *daf-16* loss-of-function genetic background

We used RNA-mediated gene interference (RNAi) to reduce the expression of either *ftt-1* or *ftt-2* *C. elegans* genes in wild type worms (hereafter denoted as N2). We verified the specificity of our RNAi constructs by quantifying *ftt-1* and *ftt-2* RNA level in N2 RNAi worms by real-time PCR (see Section 2). As shown in Fig. 1, we reported both significant and specific gene knock down of both *ftt-1* and *ftt-2* mRNA expression in worms fed with the corresponding RNAi bacteria. Moreover, similar to previous reports (Morton et al., 2002; Wang et al., 2006; Berdichevsky et al.,

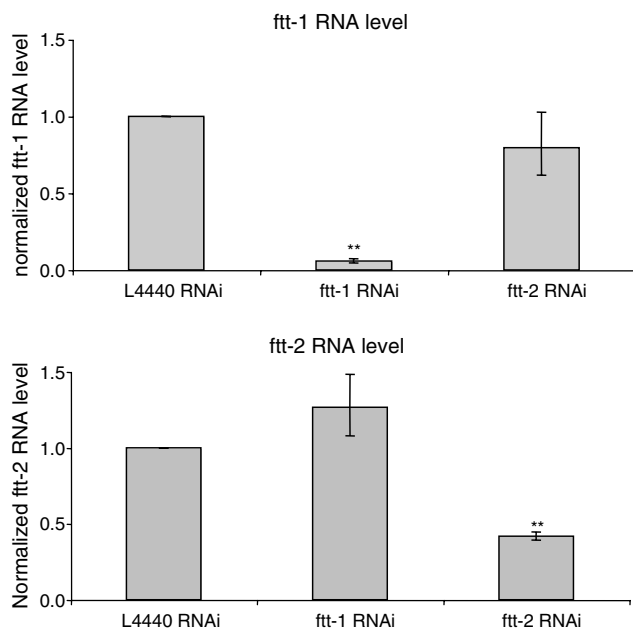


Fig. 1. The *ftt-1* and *ftt-2* RNAi treatments induce specific mRNA knock down. N2 were treated by RNAi feeding for either *ftt-1* or *ftt-2* gene specific knock down during adulthood (see Section 2). The y-axis indicates the relative RNA levels of either *ftt-1* or *ftt-2* normalized to the RNA level of tubulin (*tba-2*). One representative experiment with the standard error of the mean (SEM) is shown. The *p*-value of <0.005 (**) was determined by Student's *t*-test.

2006) using *par-5* mutants or *ftt-1* RNAi, we observed almost 100% dead embryos in the progeny of adults with *ftt-1* RNAi.

In contrast, the *ftt-2* RNAi treatment did not reveal any embryonic lethality. As previously reported (Berdichevsky et al., 2006), we observed that *ftt-1* and *ftt-2* RNAi treatments induced DAF-16::GFP nuclear localization (data not shown). Additionally, *ftt-2* RNAi during larval stage induced a low percentage of “bagging” phenotype (15% for wild type worms), as a result of internal hatching of the progeny and a small fraction (8% for wild type worms) of protruding vulvae phenotype in adults. No “bagging” phenotype was observed with *ftt-2* RNAi during adulthood. Therefore, the gene specificity of the RNAi treatment correlated with phenotypic traits.

We then assessed for 14-3-3-dependent effects on worm life span by subjecting N2 adults to either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi. As shown in Fig. 2A and Table 1, N2 worms showed a significant life span shortening while *ftt-1* RNAi yielded an intermediate life span shortening compared to *ftt-2* RNAi. This result gives an indication that N2 worms are more prone to *ftt-2* for life span modulation than to *ftt-1* when maintained in stress-free conditions since all of these experiments were conducted at 20 °C.

The DAF-16 transcription factor is believed to be situated at the major crossroads of the various regulatory pathways that modulate life span and stress resistance in *C. elegans* (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997; Kenyon, 2005; Dillin et al., 2002a). Recent reports (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006; Li et al., 2007) demonstrated new 14-3-3 regulations extending stress resistance and life span in a DAF-16-dependent manner. However, active DAF-16 inhibition by 14-3-3-dependent and -independent pathways in cell culture has been reported (Cahill et al., 2001). To clarify the relationship between 14-3-3- and DAF-16-dependent life span modulation mechanisms, we assessed life span modulation in a *daf-16(mgDf50)* deletion mutant allele treated with *ftt* RNAi. As shown in Fig. 2B and Table 1, we noticed a highly significant reduction in life span upon *ftt-2* RNAi. In contrast *ftt-1* RNAi did not induce any significant life span reduction. This unexpected result demonstrates, for the first time, that DAF-16-dependent and -independent mechanisms can be targeted by 14-3-3 to promote life span. Moreover, because life span modulation by *ftt-1* is fully suppressible by a *daf-16* loss-of-function mutation, we propose that *daf-16* is the only target of *ftt-1* for life span regulation in worms while *ftt-2* is able to modulate life span by an as yet unknown *daf-16*-independent mechanism together with a *daf-16*-dependent process.

Previous studies have already reported the RNAi potency to specifically target a given *ftt* gene product in worm (Morton et al., 2002; Berdichevsky et al., 2006; Wang et al., 2006; Li et al., 2007). Therefore, the data presented here strongly support that RNAi constructs can specifically target the corresponding *ftt-1* or *ftt-2* gene products without any cross-phenotypic consequences.

3.2. Worm life span modulation by 14-3-3 differs depending on *daf-2* mutant class allele background

Major biological outputs of the DAF-2/IGF-1 pathway are believed to elicit FOXO/DAF-16 activity modulation since strong loss-of-function mutations in the *daf-16* gene can suppress the induced phenotypes by point mutation in the DAF-2/IGF-1 receptor tyrosine kinase (Ogg et al., 1997; Lin et al., 2001). We therefore assessed 14-3-3 life span modulation effects in the *daf-2(e1365)* and *daf-2(e1370)* reduction-of-function mutant because they belong, respectively, to *daf-2* class 1 and class 2 phenotypic mutants (Gems et al., 1998). Amino-acid substitution (A580T) in the ligand-binding domain of *daf-2(e1365)* and in the tyrosine kinase receptor domain (P1465S) of *daf-2(e1370)* has been proposed to explain the phenotypic difference between both *daf-2* class mutants (Gems

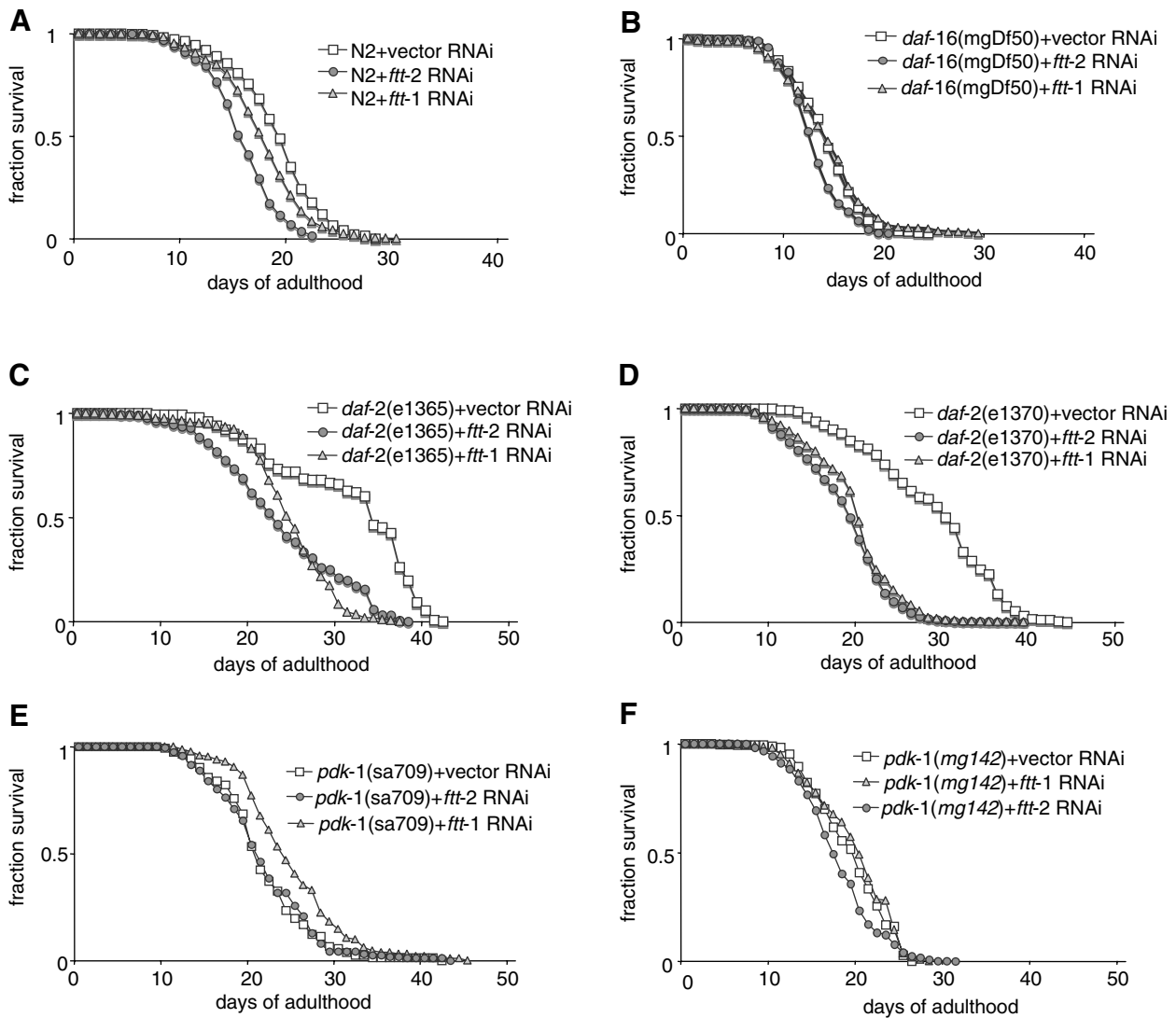


Fig. 2. Both *C. elegans* 14-3-3 can shorten adult life span but only *ftt-2* can do it in various genetic backgrounds. Adult worm life span analysis was performed on RNAi plates as described in Section 2. (A–F) The squared lines represent the life span of animals of indicated genotype fed by bacteria carrying control RNAi vector. Circle lines and triangle lines represent life spans of indicated genotypes fed with bacteria carrying either the *ftt-2* or the *ftt-1* RNAi constructs. (A) Both *ftt-2* and *ftt-1* RNAi shorten life span of wild type (N2) worms but with different order of magnitude. (B) Only *ftt-2* RNAi shortens life span in a *daf-16* null genetic background. (C and D) Both *ftt-2* and *ftt-1* RNAi can shorten life span in both *daf-2* class 1 and class 2 reduction-of-function mutants. (E and F) The *ftt-2* life span modulation operates mainly throughout *pdk-1* gene. See Table 1 for corresponding quantitative and statistical analysis. All experiments were performed at 20 °C.

et al., 1998; Nanji et al., 2005). Different *daf-2* class mutants and corresponding phenotypic traits are believed to result from the mobilisation of different signalling intermediates that originate at the DAF-2/IGF-1 receptor and result in a subset of common and different downstream unknown complex processes, that can in turn, converge to regulate the *daf-16* gene product (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005). We expected these experiments to be highly informative with respect to 14-3-3-dependent regulations on worm life span by providing new insights into 14-3-3-dependent phenotypic traits expressing or not a *daf-2* class mutant requirement to be revealed. As shown in Fig. 2C and D and Table 1, both *ftt-1* and *ftt-2* RNAi treatments induced a significant life span reduction when applied to both *daf-2* class mutants. However, as attested by the 50th percentile (see Table 1), the strongest life span reduction was observed upon *ftt-2* RNAi treatment on both *daf-2* class mutants. Moreover, relevant statistical difference between both *ftt-1* and *ftt-2* RNAi treatments was only evident on *daf-2(e1370)* and we were also surprised to note a return to a wild type mean life span of the *daf-2(e1370)* worms (compare mean life span

of experiments code A and M in Table 1) upon *ftt-2* RNAi treatment only. Altogether, these observations indicate that *daf-2(e1370)* class 2 mutant is more prone to *ftt-2*-dependent life span modulation than *daf-2(e1365)* class 1 mutant.

It has been reported that DAF-16 activity regulation mainly operates by the 3-Phosphoinositide-dependent kinase-1/AGE-1 signalling pathway in *daf-2(e1370)* class 2 rather than in *daf-2(e1365)* class 1 mutants (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005). Moreover, 3-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) has been reported to be negatively targeted in its activity by 14-3-3 (Sato et al., 2002). Our results are in agreement with the former observation if we consider that *ftt-2* may act by the same pathway in *C. elegans*. If 14-3-3 does so, we then expect to observe a pronounced life span shortening by *ftt-2* RNAi in a *daf-2(e1370)* class 2 mutant background because such effect may result in a slight rise in DAF-16 inhibition through a loss of 14-3-3-dependent negative regulation acting on PDK1. The results described above argue for such epistasis interaction. Moreover, if *pdk-1* also represents the main target for *ftt-2* regulation, one might expect to observe an

Table 1
Life span modulation by 14-3-3 depends on *C. elegans* genotype in stress-free conditions

Strain	RNAi	50th percentile ^a	Mean life span days (±SD)	Max life span	Code ^b	Statistics (KM analysis) ^c	N (censored) ^d
N2 (wt)	Control	19	18.9(0.1)	28	A	$p < 0.0001$ (B)	1024(67)
	<i>ftt-1</i>	17	16.4(0.1)	29	B	$p < 0.0001$ (C)	1590(28)
	<i>ftt-2</i>	16	15.6(0.1)	31	C	$p < 0.0001$ (A)	1501(49)
<i>daf-16</i> (<i>mgDf50</i>)	Control	14	13.9(0.1)	24	D	$p = 0.089$ (E)	806(24)
	<i>ftt-1</i>	14	14.0(0.3)	29	E	$p < 0.0001$ (F)	261(0)
	<i>ftt-2</i>	13	12.8(0.1)	20	F	$p = 0.089$ (D)	478(36)
<i>daf-2</i> (<i>e1365</i>)	Control	34	31.3(0.7)	42	G	$p < 0.0001$ (A)	170(17)
	<i>ftt-1</i>	26	25.4(0.3)	38	H	$p < 0.0001$ (B)	380(18)
	<i>ftt-2</i>	23	23.4(0.4)	38	J	$p < 0.0001$ (C)	432(22)
<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>)	Control	30	28.6(0.4)	44	K	$p = 0.623$ (J)	277(9)
	<i>ftt-1</i>	20	19.6(0.2)	39	L	$p < 0.0001$ (G)	953(0)
	<i>ftt-2</i>	19	18.5(0.1)	39	M	$p < 0.0001$ (H)	1272(4)
<i>pdk-1</i> (<i>sa709</i>)	Control	21	21.5(0.5)	42	N	$p < 0.0001$ (I)	110(58)
	<i>ftt-1</i>	24	24.7(0.4)	45	O	$p = 0.796$ (P)	186(74)
	<i>ftt-2</i>	21	21.5(0.4)	43	P	$p < 0.0001$ (N)	184(72)
<i>pdk-1</i> (<i>mg142</i>)	Control	20	19.1(0.2)	26	Q	$p = 0.796$ (N)	546(136)
	<i>ftt-1</i>	20	19.5(0.2)	28	R	$p < 0.0001$ (O)	783(75)
	<i>ftt-2</i>	17	17.6(0.2)	31	S	$p = 0.039$ (R)	736(75)

The tabulated data show the average results of four to eight independent RNAi trials. Worms of indicated genotypes were assayed for life span by feeding on the *E. coli* HT115 strain that express either *ftt-1*, *ftt-2* RNAi or control vector (see Section 2). XLSTAT-life statistical software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan–Meier method and differences between survival curves were calculated using the LogRank test with 95% confidence.

^a Represents the 50th percentile (the age when the survival fraction of animals reaches 0.50%).

^b Experiment identification code.

^c Probability of being identical to other life span experiment indicated in parentheses.

^d Total death scored (number of censored values).

unmodified life span of *pdk-1* knock out worms upon *ftt-2* RNAi while, on the other hand, the *ftt-1* RNAi should do so. We then submitted the *pdk-1(sa709)* loss-of-function allele to RNAi and, as expected (Fig. 2E), the *ftt-2* RNAi failed to affect life span significantly ($p = 0.796$; Table 1) while *ftt-1* RNAi remained with a statistically significant ($p = 0.0001$; Table 1) life span modulation activity. This result argues for the fact that *ftt-2*-dependent life span modulation operates mainly towards the *pdk-1* gene, a result fully correlated with the observed life span modulation induced by *ftt-2* RNAi in the *daf-2* class 2 mutant. However, *ftt-1* RNAi produced a positive modulation on life span during the same experiment (Fig. 2E), while we previously reported an opposite effect in both *daf-2* class mutants (Fig. 2C and D). It is possible that such *ftt-1*-dependent negative modulation on life span, also independent from the *pdk-1* component of the DAF-2/DAF-16 pathway, was previously undetectable in both *daf-2* class mutants where the strongest life span modulation was observed.

In an attempt to specify either *ftt-1* or *ftt-2* respective life span effects throughout PDK-1 signalling modulation, we next assessed a *pdk-1(mg142)* gain-of-function mutant for RNAi knock down experiment. As shown in Fig. 2F, the *ftt-2* RNAi but not the *ftt-1* RNAi induced a significant life span modulation in comparison with control. This result is relevant to a negative modulation of

pdk-1 activity by *ftt-2* that can be highlighted here by a life span shortening effect upon RNAi. The absence of a significant modulation effect on life span by *ftt-1* in the same genetic background also reinforces the view that *ftt-1* does not regulate life span towards *pdk-1* in the DAF-2/DAF-16 regulatory pathway (Fig. 2F and Table 1) and also indicates that *ftt-1* negative modulation on life span is also masked in the *pdk-1* gain-of-function background as observed below for both *daf-2* class mutants.

Thus, we show here for the first time a *daf-2* class mutant-dependent modulation of 14-3-3 on *C. elegans* life span regulation. These results indicate that 14-3-3 influences longevity not only when DAF-2 activity is high and DAF-16 low (as in N2), but also when DAF-2 activity is low and DAF-16 high (as in *daf-2* mutants). Therefore, while *ftt-1*-dependent life span modulation is restricted to N2 and only one of both *daf-2* class mutants, the *ftt-2*-dependent life span modulations can affect N2 and both *daf-2* class mutants assessed, as well as a *daf-16* loss-of-function background. This observation argues for the predicted *ftt-2* gene function on life span modulation previously defined on the basis of its expression pattern (Morton et al., 2002; Wang et al., 2006) in comparison with the one of *ftt-1*. Moreover, on the basis of respective modulation of life span reported here with *ftt* RNAi on *daf-2* class mutants, we present here further evidence arguing that *ftt-2* is a more potent

life span modulator than *ftt-1*. Altogether, our results indicate that *ftt-2* can modulate worm life span with different order of magnitude depending on the DAF-2/DAF-16 transduction level targeted that can be summarised for by a strong modulation effect when transduction levels targeted lie between *daf-2* and *pdk-1* then intermediate effect when transduction targeted levels are between *pdk-1* and *daf-16* and discrete modulation effect by a *daf-16*-independent mechanism.

3.3. *ftt-2* modulates intrinsic worm thermotolerance

Daf-2 reduction-of-function mutants show an increased intrinsic thermotolerance (*itt*) phenotype (Lithgow et al., 1995) and conversely, heat-shock treatment can induce rapid nuclear localization of DAF-16 (Henderson and Johnson, 2001; Henderson et al., 2006). Because this *itt* phenotype trait is believed to require DAF-16 activity (Lin et al., 2001) we then assessed for *ftt-1* and *ftt-2* involvement in this process. As shown in Fig. 3A, no thermal resistance difference between N2 worms fed with either control RNAi or *ftt-2* RNAi was noted while we observed a slight and time limited ($p = 0.05$) significant resistance difference when *ftt-1* RNAi. On the opposite, *daf-2(e1370)* or *daf-2(e1365)* worms subjected to same treatment after either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi (Fig. 3B and C) were less resistant. As attested by the level of significance observed ($p = 0.005$), a protracted effect on *daf-2(e1370)* thermal stress resistance was observable upon *ftt-2* RNAi while a delayed but strongest effect was noted when *ftt-1* RNAi (Fig. 3B). A comparable modulation by both *ftt-1* and *ftt-2* RNAi on thermal stress resistance was observed for *daf-2(e1365)* genetic background (Fig. 3C).

This observation may indicate, as we reported for life span, that intrinsic thermotolerance of both *daf-2* class mutant allele worms is prone to *ftt*-dependent regulation than wild type. More interestingly, the rise in thermal stress sensitivity when *daf-2* mutant worms were fed with *ftt-2* RNAi was not observable when *daf-16(mgDf50)* mutant or *pdk-1(sa680)* loss-of-function mutant (Fig. 3E) were fed by the same (Fig. 3D). Moreover, identical result was noted upon *ftt-1* RNAi (Fig. 3D and E). This observation indicates that the *itt* trait phenotype is a part of the stress resistance mechanism allowing *ftt-2* and, to a lesser extent *ftt-1*, to specifically promote worm life span throughout DAF-16-dependent mechanism as described here and in Berdichevsky et al. (2006). The lack of *ftt-2* RNAi effect on N2 worms upon thermic stress may be due to a threshold sensibility difference in comparison with *daf-2* mutants, which are also regarded as constitutively stressed worms, thereby explaining, as described (Berdichevsky et al., 2006), the higher sensitivity of stress-resistant mechanisms to 14-3-3-dependent regulation. However, these results are in agreement with the expected *itt* phenotype for the corresponding genetic backgrounds tested, because *daf-16(mgDf50)* appeared less heat-resistant than wild type or *daf-2(e1370)* mutant worms in control RNAi conditions.

3.4. *ftt-2* can modulate various stress responses

DAF-2/IGF-1 pathway regulates stress resistance in worm (Gems et al., 1998) and treating a *daf-2(e1370)* mutant with *daf-16* RNAi during the reproductive period can also modulate its life span (Dillin et al., 2002a). DAF-16 gene products are believed to act as major cellular defense regulators when worms are facing stress. However, while some stress-responsive genes, as for example *sod-3* (Henderson et al., 2006; Honda and Honda, 1999; Murphy et al., 2003; Lee et al., 2003b; McElwee et al., 2003; Oh et al., 2006), are mainly FOXO/DAF-16 targets, other stress-inducible genes, such as heat-shock proteins (HSPs), can be synergistically regulated by FOXO/DAF-16 and HSF-1 transcription factors (Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004). Moreover, it has been

demonstrated that DAF-16 is essential for maximal *hsp-16* expression and for life span extension conferred by *hsp-16* overexpression (Walker and Lithgow, 2003). Glutathione S-transferases (GSTs), oxidative stress-responsive gene products, are believed to participate in metabolisation of cell compounds by post-translational glutathione tripeptide conjugation. Moreover, GSTs have already been reported to be up-regulated in *daf-2* mutant (McElwee et al., 2006) and by various physical or ROS-inducer chemical stressors (Leiers et al., 2003). We therefore decided to test for stress-responsive gene modulation during adulthood of *ftt-2* RNAi-induced worms because it had already been reported (Dillin et al., 2002a) that DAF-2/IGF-1 pathway could influence ageing and stress resistance during ageing. To this aim, we used a GFP reporter which had been used to assay for DAF-16 activity: The *sod-3::GFP* (Berdichevsky et al., 2006; Libina et al., 2003), as well as a HSP reporter: *hsp-16::GFP* (Link and Johnson, 2002) and the oxidative stress-inducible reporter transgene *gst-4::GFP* (Leiers et al., 2003; Link and Johnson, 2002) whose constitutive or ROS-induced expression is not dependent on DAF-16 activity (Henderson et al., 2006). As shown in Fig. 4, while the expression level of these GFP reporters does not appear to change between adulthood day 4 to day 18 (compare Fig. 4A and B; E and F; I and J) in control worms, the expression pattern becomes greatly modified during the same adulthood interval when worms are fed with *ftt-2* RNAi (compare Fig. 4C and D; G and H; K and L). However, we can clearly discriminate two groups of GFP reporter genes from which induction response to *ftt-2* RNAi treatment differs. One first group with a high expression induction level (*sod-3::GFP* and *gst-4::GFP*) and a second with a limited induction level (*hsp-16::GFP*). To increase discriminative analysis of reporter transgenes, we decided to perform pixel quantification analysis for both successive groups of growing old worms (see Section 2). As shown in Fig. 4M, we detected a gradual rise in the expression level for each transgene during ageing and, as expected, to a lesser extent for *hsp-16::GFP* transgene. Moreover, the limited *hsp-16::GFP* rise in expression is also notable when we compare both adulthood periods tested. By contrast, we noted (particularly at day 18 of adulthood) an important change for *sod-3::GFP* reporter expression level while *gst-4::GFP* showed an intermediate level of induction. Because these experiments were conducted in a stress-free condition, we conclude that stress-responsive GFP transgenes have been tested for their basal *ftt-2*-dependent regulation during normal ageing. This observation sheds new light on the regulatory links between the DAF-2/IGF-1 pathway – believed to influence ageing and stress resistance in growing old worms by a *daf-16* dependent mechanism – and *sod-3::GFP* gene activation. However, we reported here that *hsp-16::GFP*, another stress-inducible gene, behaves differently during the same recorded adulthood time, from *sod-3::GFP*. This observation may indicate that *hsp-16* gene expression regulatory mechanisms are less prone to *ftt-2* regulatory activity in an environment devoid of stress. Moreover, these results are in complete agreement with our previous experiments showing a lack of involvement of 14-3-3/*ftt-2* for *itt* phenotypic trait in wild type worms. Altogether, our observations argue for a sustained involvement of *ftt-2* gene product for stress-responsive gene regulation during adulthood as reported for the DAF-2/IGF-1/DAF-16 pathway. Moreover the interesting observation of a pronounced *sod-3::GFP* transgene induction at day 18 in comparison with day 4 upon treatment with *ftt-2* RNAi (compare Fig. 4C and D) may also point out that regulatory mechanisms operating to maintain the physiological status of growing old worms are not the same during the whole post-developmental period. A recent report (Henderson et al., 2006) introduced that oxidative stress could induce nuclear translocation of DAF-16 without any detectable overexpression of *sod-3::GFP* reporter. However, our experiments clearly demonstrate a strict relationship between nuclear DAF-16 translocation

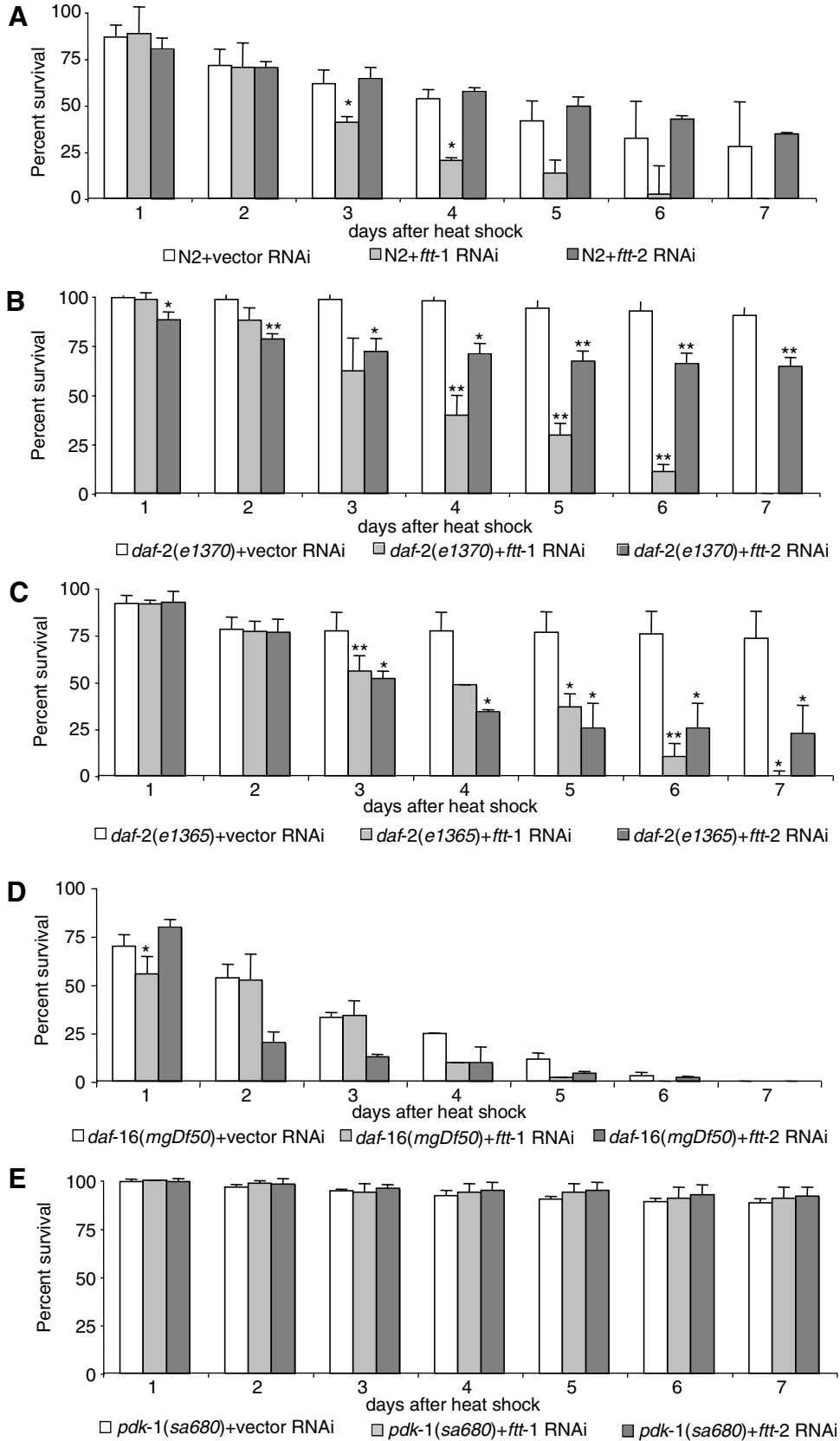


Fig. 3. *ftt-2* RNAi knock down shortens worm survival after heat-shock induction in *daf-2* reduction-of-function background but not in both wild type (N2) and *daf-16* loss-of-function genetic background. (A–E) Young adults of the indicated genotype were fed by bacteria carrying either *ftt-1*, *ftt-2* or control RNAi construct, then subjected to heat shock (see Section 2) and their viability scored at the indicated times. Results presented are mean values \pm SEM of five independent experiments. Statistical analysis was done by a Student's *t*-test where **p* indicates *p* < 0.05 significance level. All experiments were performed at 20 °C.

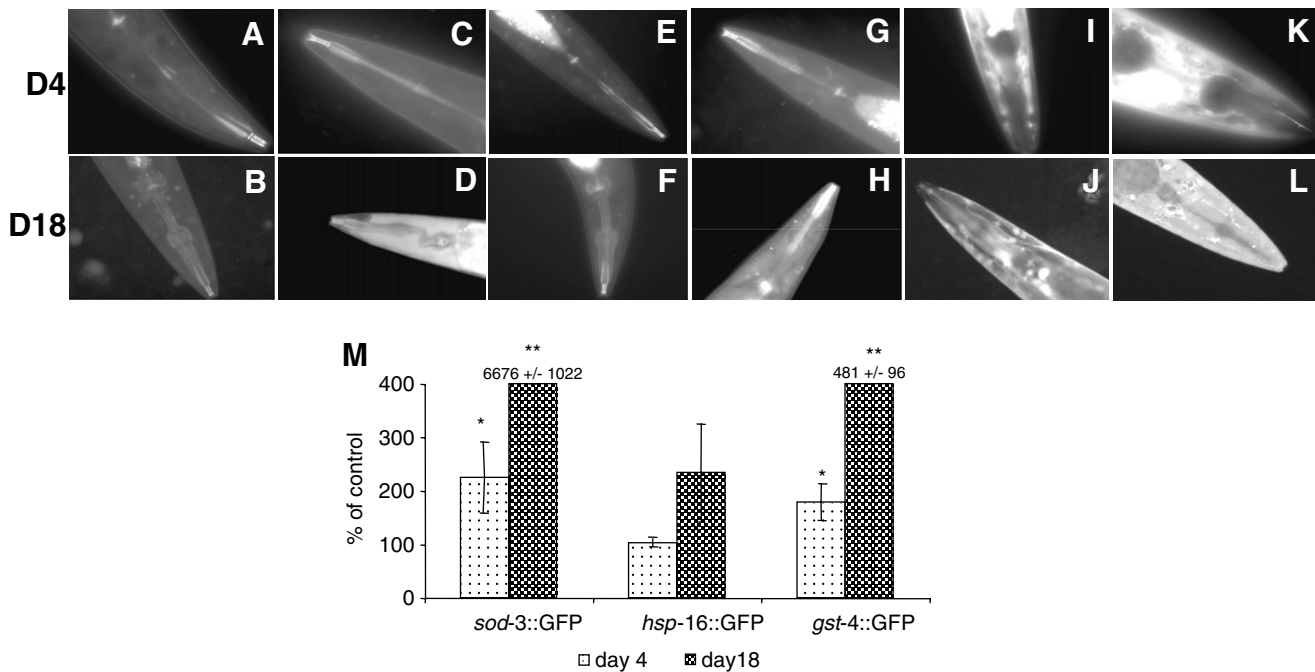


Fig. 4. *ftt-2* RNAi can promote activation of stress-responsive gene reporters during adulthood in non-stressing conditions. (A–L) Wild type (N2) young adult worms carrying either a *sod-3::GFP* (A–D), a *hsp-16::GFP* (E–H) or a *gst-4::GFP* (I–L) stress reporter transgene were fed by bacteria carrying either control RNAi vector (A and B; E and F; I and J) or *ftt-2* RNAi construct (C and D; G and H; K and L) and scored for transgene expression at 4th (A, C, E, G, I, K) and 18th days (B, D, F, H, J, L) of adulthood by fluorescence microscopy as described in Section 2. Note higher level of *sod-3::GFP* transgene expression at day 18 of adulthood only when worms fed *ftt-2* RNAi construct (D) in comparison with same worms scored at 4th day of adulthood (C) or with worms fed on control RNAi at both days of adulthood (A and B). Both *sod-3::GFP* (C and D) and *gst-4::GFP* (K and L) transgene inductions during adulthood are greater than *hsp-16::GFP* (G–H) when compared to controls at both adulthood periods (*sod-3::GFP*: A and B; *hsp-16::GFP*: E and F; *gst-4::GFP*: I and J). All images were taken at 400× magnification using fluorescence microscopy with an exposure time of 1000 ms for A–D; 200 ms for E–H and 1000 ms for I–L. All experiments were performed at 20 °C. The positive transgene induction control tests are not shown. (M) *ftt-2* RNAi-dependent induction of stress-responsive genes during adulthood. Wild type (N2) young adult worms carrying either *sod-3::GFP*, *hsp-16::GFP* or a *gst-4::GFP* stress reporter transgene were fed by bacteria carrying either control RNAi vector or *ftt-2* RNAi construct and scored for stress-responsive transgene expression at 4th and 18th days of adulthood. Quantifications were done by fluorescence microscopy as described in Section 2 on at least ten animals. Bars represent the standard error (SEM) and mean values are expressed after normalization with respective control RNAi, which represent 100%. Statistical Student's *t*-test (*p*-value <0.05; ***p*-value <0.0005) comparison between day 4 and day 18 values are: ***p* = 0.0003 for *sod-3::GFP*; *p* = 0.09 for *hsp-16::GFP* and **p* = 0.01 for *gst-4::GFP*. All experiments were performed at 20 °C.

and *sod-3::GFP* reporter induction in non-stress induction conditions although upon *ftt-2* RNAi.

3.5. *ftt-2* modulates worm oxidative stress resistance by a *daf-16*-independent mechanism

The DAF-2/DAF-16 regulatory pathway is believed to link worm oxidative stress resistance to life span (Finkel and Holbrook, 2000; Hsu et al., 2003). We therefore investigated the effect of Menadione in different genetic backgrounds, believed to affect worm oxidative stress resistance. The Menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone or vitamin K3) is a lipid-soluble substance that has been extensively used as an oxidant stressor in yeast (Shackelford et al., 2000) as well as in *Arabidopsis thaliana* (Baxter et al., 2007). Menadione can generate reactive superoxide ions, which can be further oxidized to yield hydrogen peroxide and has been reported to deplete total glutathione concentration in yeast cells by generation of menadione S-glutathione conjugates (Zadzinski et al., 1998).

We examined the effect of Menadione by determining survival of adult worms subjected to 10 mM Menadione after 1 week of either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi treatment (see Section 2). As expected in control conditions, the *daf-16(mgDf50)* mutant was less resistant (Fig. 5D) to Menadione treatment than N2 (Fig. 5A), which also appeared less resistant to both *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1365)* reduction-of-function mutants (Fig. 5B and C). Moreover, we observed that *daf-16* mutant life span was significantly reduced (*p* = 0.005) upon both *ftt* RNAi in comparison with control RNAi (Fig. 5D) while the same treatment did not induce a significant survival difference

in either N2 or *daf-2(e1370)* genetic background (Fig. 5A and B). However, we observed a time limited significant effect of *ftt-1* RNAi on *daf-2(e1365)* loss-of-function mutants, survival (Fig. 5C). Altogether, our results indicate that both *ftt-1* and *ftt-2* are involved in promoting Menadione oxidative stress resistance by acting through a *daf-16*-independent pathway. Although the mechanism through which *ftt-1* and *ftt-2* promotes *daf-16(mgDf50)* stress resistance is yet unknown, it is possible that different mechanism operates because we previously demonstrated that *ftt-2* is the only 14-3-3 ortholog able to promote life span in both *daf-16* loss-of-function and *daf-2* reduction-of-function genetic backgrounds. Altogether, these findings show that *ftt-2* can determine stress resistance even in a non-stress-resistant genetic background such as *daf-16(mgDf50)*.

3.6. Dauer formation can be enhanced by *ftt-2* inactivation

Several *daf-2* thermosensitive (*ts*) reduction-of-function mutations can result in constitutive dauer larval formation: a quiescent (i.e. a non-obligatory stress-resistant arrested stage that differs from obligatory diapause stage affecting other worm species) larval stage with developmental arrest, non-feeding activity, stress resistance and long-lived characteristics (Klass and Hirsh, 1976). Dauer induction fold seems to depend on *daf-2ts* class alleles that can be summarised as more severe for class 2 and weaker for class 1 mutant. Therefore, the semi-restrictive temperature (22.5 °C) applied to *daf-2ts* mutants can modify the population that constitutively enters the dauer stage (Gems et al., 1998). We believed that such semi-restrictive temperature would help us to reveal

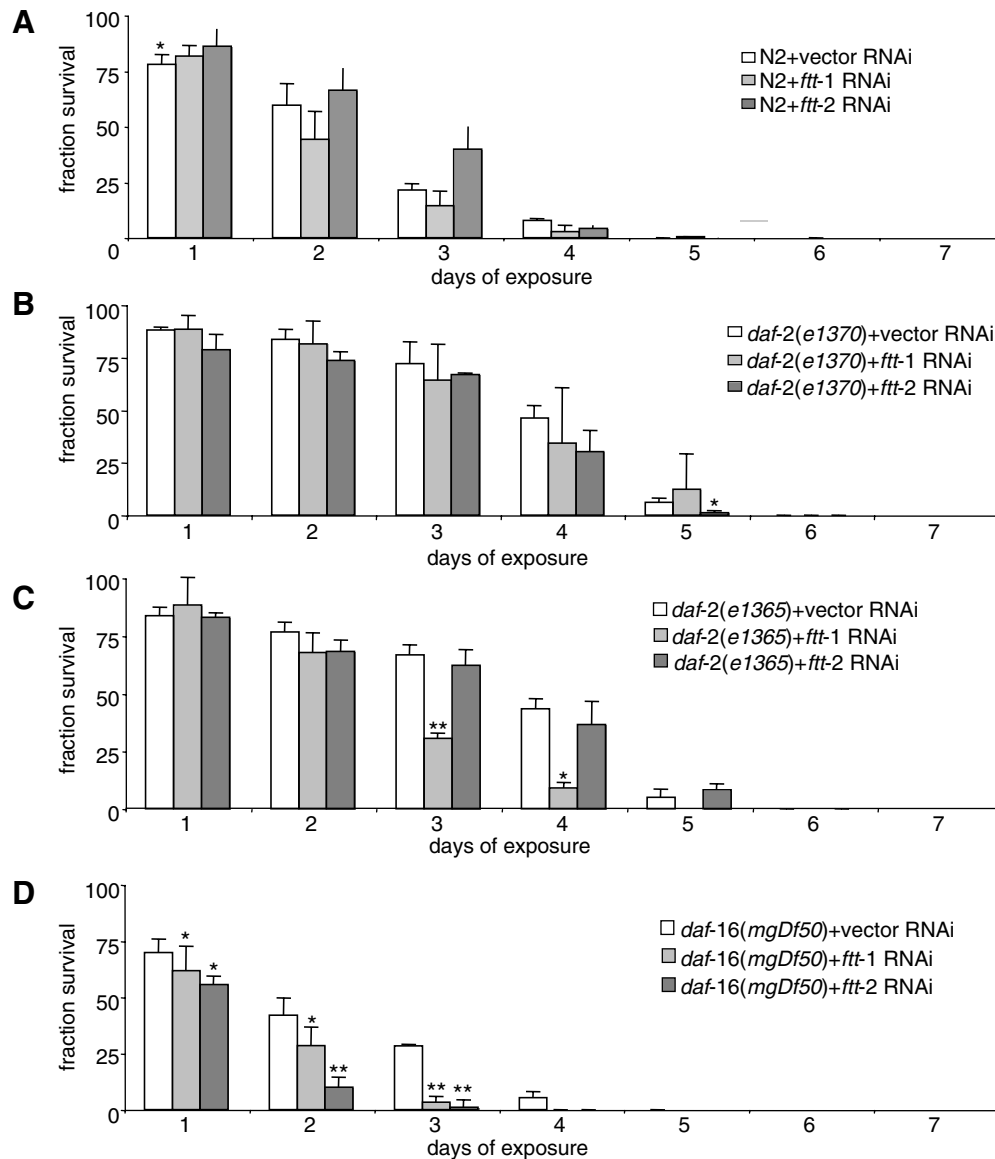


Fig. 5. Both *ftt* RNAi knock down prevent oxidative stress resistance by a *daf-16*-independent mechanism. (A–D) Young adults of the indicated genotype were fed by bacteria carrying either *ftt-1*, *ftt-2* or control RNAi construct, then subjected to oxidative treatment by 10 mM Menadione (as described in Section 2) and their viability scored at the indicated time. Results presented are mean values \pm SEM of at least five independent experiments. Statistical analysis was done by a Student's *t*-test at $p < 0.05$ and $** p < 0.0005$ significance level. The total number of worms scored for each genotype and RNAi condition are in parentheses: Wild type Control RNAi ($N = 218$); Wild type-*ftt-1* RNAi ($N = 174$); Wild type-*ftt-2* RNAi ($N = 238$); *daf-16(mgDf50)*-Control RNAi ($N = 169$); *daf-16(mgDf50)*-*ftt-1* RNAi ($N = 587$); *daf-16(mgDf50)*-*ftt-2* RNAi ($N = 180$); *daf-2(e1365)*-Control RNAi ($N = 159$); *daf-2(e1365)*-*ftt-1* RNAi ($N = 164$); *daf-2(e1365)*-*ftt-2* RNAi ($N = 183$); *daf-2(e1370)*-Control RNAi ($N = 219$); *daf-2(e1370)*-*ftt-1* RNAi ($N = 277$); *daf-2(e1370)*-*ftt-2* RNAi ($N = 193$). All experiments were performed at 20 °C.

possible *ftt-1* or *ftt-2*-dependent dauer formation process by generating a facilitated constitutive dauer commitment subthreshold. We therefore assessed relevant class 2 *daf-2(e1370)* and class 1 *daf-2(e1365)* allele for dauer formation upon *ftt-2* RNAi at 22.5 °C.

While *ftt-1* RNAi produced no detectable effect on dauer formation in all genetic backgrounds tested (Fig. 6), we observed a highly significant difference ($p = 0.005$) upon *ftt-2* RNAi on *daf-2* class 1 mutant and a less significant difference ($p = 0.05$) on *daf-2* class 2 mutant (Fig. 6). This observation indicates that class 1 *daf-2*ts mutant alleles are more prone to *ftt-2*-dependent regulation than class 2 for dauer commitment while we reported the opposite effect for life span assays. This observation indicates for the first time the existence of a *daf-2* class mutant allele-specific modulation for dauer formation by *ftt* genes. However, because dauer entry and exit are not equivalent physiological processes, as revealed by time course microarray analysis (Wang

and Kim, 2003), we next asked if dauer exit might behave with the same difference between both *daf-2* mutants alleles tested. We then checked dauer population and observed full dauer exit for both *daf-2* reduction-of-function allele populations 120 h after hatching.

3.7. *ftt-2* influences worm life span by acting during development

While *daf-2* RNAi can influence ageing when applied only during worm adulthood (Kenyon, 2005; Dillin et al., 2002a), *daf-2* deletion mutants are affected by non-conditional arrest at embryonic or first larval stage (Gems et al., 1998). In addition, genes encoding mitochondrial respiratory chain components have been reported to influence worm life span if reduction-of-function, mimicked by RNAi, was applied only before the reproductive stage (Dillin et al., 2002b; Lee et al., 2003a).

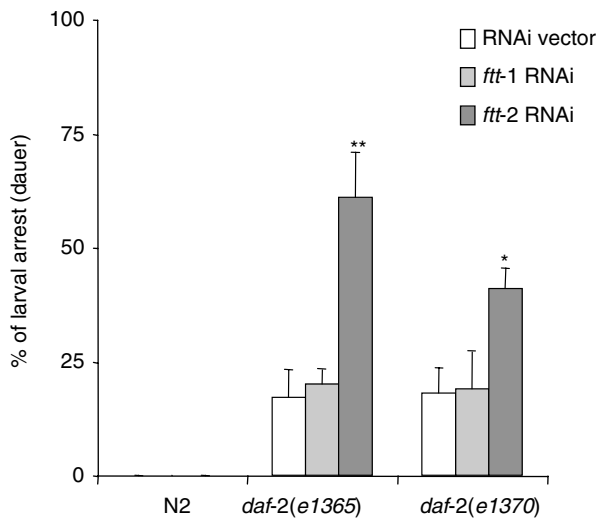


Fig. 6. *ftt-2* RNAi knock down promotes dauer constitutive induction phenotype in both *daf-2* class 1 and 2 reduction-of-function mutants. Worms of indicated genotype were allowed to hatch on bacteria carrying either *ftt-1*, *ftt-2* or control RNAi construct at 22.5 °C in order to create a dauer constitutive phenotype induction subthreshold. Dauer larval arrest was scored as described in Section 2. The total number of worms scored for each genotype and RNAi condition are in parentheses: Wild type Control RNAi (N = 469); Wild type-*ftt-1* RNAi (N = 130); Wild type-*ftt-2* RNAi (N = 475); *daf-2(e1370)*-Control RNAi (N = 1219); *daf-2(e1370)*-*ftt-1* RNAi (N = 480); *daf-2(e1370)*-*ftt-2* RNAi (N = 1052); *daf-2(e1365)*-Control RNAi (N = 1138); *daf-2(e1365)*-*ftt-1* RNAi (N = 621); *daf-2(e1365)*-*ftt-2* RNAi (N = 1235). Results presented are mean values \pm SEM of at least five independent experiments. Statistical Student's *t*-test was used to compare data from control and *ftt* RNAi fed worms and give either $p < 0.05$ and $p < 0.0005$ threshold significance level.

We observed a variation in the worm populations that did not arrest at dauer stage upon either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi at semi-restrictive temperature. Thus, while 82% of *daf-2(e1370)* worms did not arrest at dauer stage on control RNAi (see Section 2), the corresponding rate decreased to 59% and reached up to 81% when worms were fed for *ftt-2* and *ftt-1* RNAi, respectively.

Moreover, in the *daf-2(e1365)* genetic background, non-dauer arrested worm fraction reached 83% on control RNAi but only 39% on *ftt-2* RNAi while *ftt-1* RNAi induced a comparable rate to wild type as 80%. Wild type worms did not reveal any dauer formation on control or on both RNAi treatments at 22.5 °C and 25 °C too (data not shown).

We then assessed the worm fraction with uninterrupted larval stage progression for developmental rate during RNAi knock down. Both wild type and *daf-16(mgDf50)* worms fed by *ftt-2* or *ftt-1* RNAi protracted 24 h to reach the fourth larval stage (96 h after hatching) when compared to control worms. Moreover, both *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1365)* worms protracted 48 h to reach the fourth larval stage (120 h after hatching) when *ftt-2* RNAi but only 24 h (96 h after hatching) when *ftt-1* RNAi. This observation indicates that *ftt-2*, and to a lesser extent *ftt-1*, reduction-of-function applied during worm development can induce a “slow living phenotype” by perhaps acting, more or less directly, through the modulation of a yet unknown transduction pathway able to induce other defects as reported here and in previous reports (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006).

Because development was affected with the same order of magnitude on both *daf-2* class mutants at semi-restrictive temperature, we then addressed for a possible influence of this developmental modulation on subsequent post-developmental stages.

To this aim, worms that reached the fourth larval stage were shifted to *ftt-2* or *ftt-1* RNAi-free condition at 22.5 °C and assessed for life span (see Section 2). As shown in Fig. 7, we observed a highly significant ($p = 0.001$) life span shortening for wild type

worms induced with *ftt-2* RNAi than *ftt-1* RNAi in comparison with controls (Fig. 7A and Table 2). Moreover, both *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1365)* worms showed a remarkable life span shortening on both RNAi (Fig. 7C and D and Table 2) in comparison with non-induced worms and wild type worms after equivalent treatment (Table 2). This unexpected result highlights for the first time that *ftt-2*, and to a lesser extent *ftt-1*, RNAi knock down can shorten life span if administered only during development in both wild type and *daf-2* reduction-of-function mutants.

Moreover, the observed higher mortality rate for both *daf-2* class mutants indicates that they are more prone than wild type worms to *ftt*-dependent regulations for development – a similar observation is also reported below for post-developmental life span experiments (Fig. 2; Table 1).

However, because *daf-16(mgDf50)* worms behaved the same as both *daf-2* mutants (Fig. 7B), we also conclude that *ftt*-dependent control of development involves both DAF-2/DAF-16-dependent and -independent regulatory mechanisms.

The high mortality rate and mortality curve shape observed during our experiments may reflect possible non-specific sickness acting on life span by *ftt* RNAi knock down but other observations argue against such a simple conclusion. Thus, as shown in Table 2, it is possible to observe that *ftt* RNAi do not impair by the same worms' life span with different genetic backgrounds. For example, while the *ftt-2* RNAi induced a 26% mean life span reduction in wild type, we showed a here 60% mean life span reduction for *daf-2(e1365)* and up to 67% reduction for *daf-2(e1370)* while *daf-16(mgDf50)* worms were less affected with a 44% mean life span reduction only.

If *ftt* RNAi knock downs produce a non-specific effect on life span, one might expect a proportional linear rise in life span reduction from short-living worms (as *daf-16(mgDf50)*) to long-living worms (*daf-2* class mutants). However, this was not the case because short-living worms were more affected than wild type worms. Moreover, the *daf-2* class 2 (*daf-2(e1370)*) life span was more affected upon *ftt-2* RNAi than *daf-2* class 1 (*daf-2(e1365)*) as already reported for post-developmental life span experiments below (Fig. 2 and Table 1) were *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1365)* life span were reduced by 36% and 32%, respectively.

This observation provides new insight into both *ftt-2*- and *ftt-1*-dependent regulations on life span that need to be specifically assessed during development or adulthood to avoid misinterpretation of results due to possible unrelated cumulative effects produced by *ftt* RNAi administered during pre- and post-reproductive periods. For example, while we reported both a small percentage of protruding vulvae phenotype (15%) and bagging phenotype in adult worms fed on OP50 bacteria after *ftt-2* RNAi induced during development, we noted that the same *ftt-2* RNAi treatment applied during adulthood induced only the life span reduction phenotype. Therefore, noticing that *daf-2* mutant life expectancy was more affected than the wild type clearly indicates that *ftt-2*, and to a lesser extent *ftt-1*, acts as a more potent modulator during development when DAF-2 signalling is low and DAF-16 activity high.

3.8. *Caenorhabditis elegans* fat storage can be modulated by *ftt-2*

During our dauer commitment analysis we noted a reproducible “dark appearance” shape variation between control and *ftt-2* RNAi-induced worms. Such “dark appearance” shape phenotype can be explained by lipid droplet accumulation as already described for *daf-2* reduction-of-function mutation or dauer larvae (Kimura et al., 1997).

The increased fat content trait of *daf-2* mutants has been shown to be fully suppressible by *daf-16* mutants (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997) and we reported below (Fig. 6) that *ftt-2* but not *ftt-1*

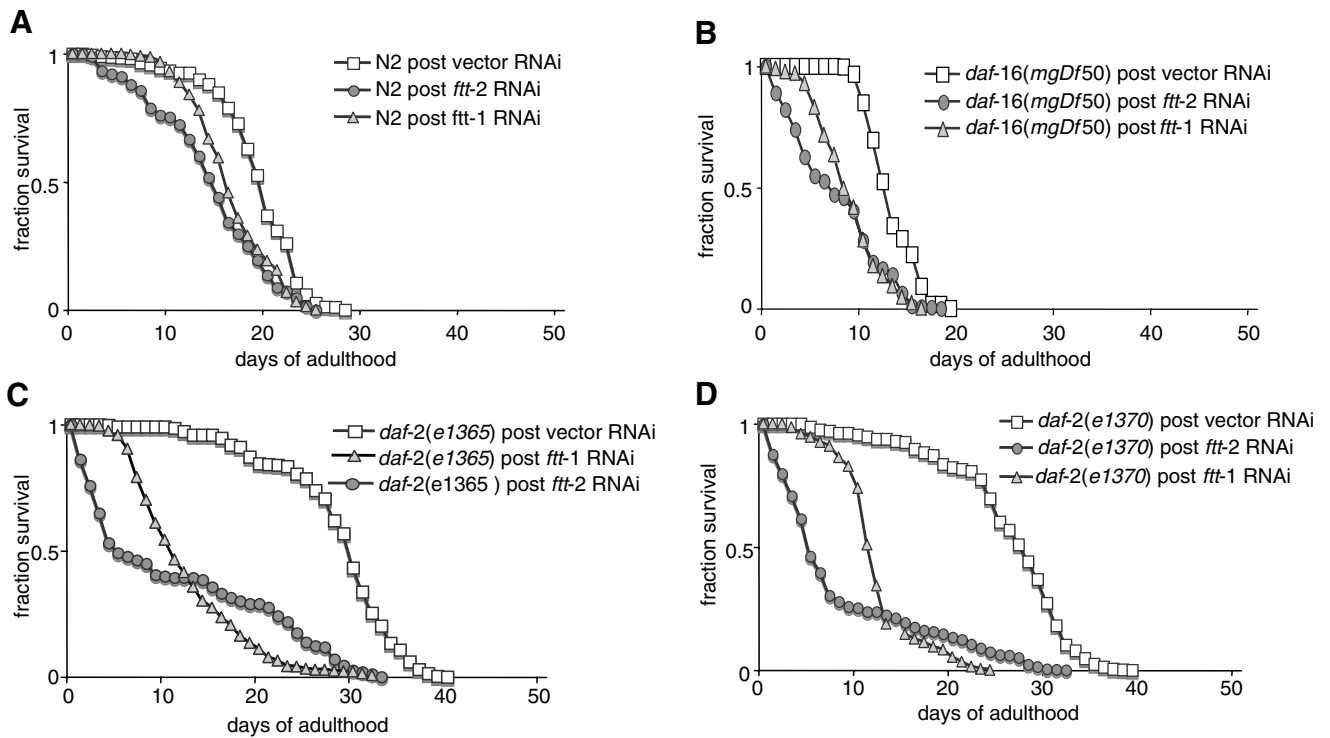


Fig. 7. Reducing *ftt-2* by RNAi during development leads to apparent sickness at subsequent post-developmental stage. Worms of indicated genotype were allowed to hatch on bacteria carrying either *ftt-1*, *ftt-2* or control RNAi. Worm population that did not arrest as dauers was fed on bacteria carrying either control RNAi vector or *ftt-1* or *ftt-2* RNAi until they reached young adult stage then transferred on new plates and fed by classical OP50 *E. coli* strain then scored for life span. Shortening life span in all of genetic backgrounds was also characterised by sickness defects such as bagging or protruding vulvae phenotype. See text for details and Table 2 for corresponding quantitative and statistical data analysis. All of the experiments were conducted at 22.5 °C.

Table 2
Caenorhabditis elegans life span shortening by pre-reproductive *ftt-2* RNAi induction

Strain	RNAi during development	Mean life span days (\pm SD) ^a	Max life span	Code	Statistics (KM analysis) ^b	N (censored) ^c
N2 (wt)	Control	19.0(0.2)	28	A	$p < 0.0001$ (B) $p < 0.0001$ (C)	561(11)
	<i>ftt-1</i>	16.4(0.3)	25	B	$p < 0.0001$ (A) $p = 0.007$ (C)	241(50)
	<i>ftt-2</i>	14.2(0.3)	25	C	$p < 0.0001$ (A) $p = 0.007$ (B)	384(72)
<i>daf-16</i> (mgDf50)	Control	13.0(0.1)	19	D	$p < 0.0001$ (E) $p < 0.0001$ (F)	359(17)
	<i>ftt-1</i>	8.7(0.2)	16	E	$p < 0.0001$ (D) $p = 0.153$ (F)	208(20)
	<i>ftt-2</i>	7.3(0.3)	18	F	$p < 0.0001$ (D) $p = 0.153$ (E)	318(9)
<i>daf-2</i> (e1365)	Control	28.6(0.4)	40	J	$p < 0.0001$ (K) $p < 0.0001$ (L)	342(6)
	<i>ftt-1</i>	12.5(0.2)	35	K	$p < 0.0001$ (J) $p = 0.614$ (L)	620(95)
	<i>ftt-2</i>	11.4(0.6)	33	L	$p < 0.0001$ (J) $p = 0.614$ (K)	348(0)
<i>daf-2</i> (e1370)	Control	26.1(0.3)	39	G	$p < 0.0001$ (H) $p < 0.0001$ (I)	494(13)
	<i>ftt-1</i>	12.0(0.2)	24	H	$p < 0.0001$ (G) $p < 0.0001$ (I)	425(68)
	<i>ftt-2</i>	8.4(0.4)	32	I	$p < 0.0001$ (G) $p < 0.0001$ (H)	435(0)

The tabulated data show the average results of four to five independent RNAi trials at 22.5 °C.

Worms of indicated genotypes were fed on *E. coli* HT115 strain bacteria expressing either *ftt-2*, *ftt-1* or control RNAi during pre-reproductive developmental period then transferred to RNAi-free conditions and assayed for life span (see Section 2).

XLSTAT-life statistical software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan–Meier method and differences between survival curves were calculated using the LogRank test with 95% significance.

^a Mean life span values (standard deviation).

^b Probability of being identical to other life span experiment indicated in parentheses.

^c Total death scored (number of censored values).

RNAi can increase dauer larvae (a well-characterised resistant stage with high lipid accumulation) commitment in two different *daf-2* class mutants together with a more significant effect for class 1 mutant allele. Moreover, it has been demonstrated that some *daf-2* mutations (class 2) can induce dauer-like trait expression in adults while others (class 1) do not and show a normal metabolism instead (Gems et al., 1998). However, recent microarray analysis reported the identification of a transcriptional product group whose expression was highly similar in both dauers and *daf-2* mutant adults (McElwee et al., 2003, 2006) while some other groups behaved differently. We therefore assessed if *ftt-2* or *ftt-1* could influence lipid metabolism in both *daf-2* class mutant alleles with the same order of difference as for dauer commitment. As shown in Fig. 8A–L, the apparent fat content of *daf-16(mgDf50)*: Fig. 8D and F, and *daf-2(e1365)*: Fig. 8G and I was reduced upon *ftt-2* RNAi while both wild type worms (Fig. 8A and C) and *daf-2(e1370)* fat content (Fig. 8J and L) appeared less affected. Nevertheless, the *ftt-1* RNAi did not induce apparent lightening in lipid staining except for *daf-2(e1370)* genetic background (Fig. 8K and L).

Therefore, relative quantification (see Section 2) of Nile red lipid staining (Fig. 9) provided more insight with respect to the difference of fat storage that appeared more significantly impaired in *daf-2(e1365)* and *daf-16(mgDf50)* worms than in *daf-2(e1370)* and N2 worms when *ftt-2* RNAi while *ftt-1* RNAi produced a significant lipid staining reduction in *daf-2(e1370)* worms only.

This observation provides novel insights into the striking opposite effect of *ftt-2* RNAi on both dauer induction and its accompanying lipid droplet accumulation trait. More unexpectedly, we also found a significant fall of lipid droplet accumulation in a dauer defective genetic background mutant as *daf-16(mgDf50)*. On the basis of this experimental evidence, we propose that *ftt-2* can promote lipid accumulation by a *daf-16*-independent pathway. Therefore, *ftt-2* can increase dauer commitment in *daf-2* class 1 mutant allele, an observation indicating a modulation via alternative regulatory pathway that may (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005) or may not emerge from the DAF-2 receptor. Thus, while both dauers and *daf-2* adults contain large quantities of lipid droplets, it has been reported (Walker and Lithgow, 2003) that triglyceride synthesis enzymes are not expressed in the same fashion during these two *C. elegans* life history stages leaving open possible differences in the regulatory pathways targeted by *ftt-2* besides DAF-2/IGF-1 regulatory pathway. Moreover, a quantitative mass spectrometry analysis reported (Dong et al., 2007) a subset of significant abundant proteins in *daf-2(e1370)* mutant were able to either slow down or accelerate ageing rate when targeted by RNAi knock down then living open the possibility for compensatory mechanism with opposite effects on the rate of ageing but altogether with a positive global effect as observed in long-living *daf-2* mutants. It is possible that some molecular targets of *ftt-2* may fall into both classes of protein thereby explaining opposite effects on dauer commitment and lipid accumulation reported in this study.

4. Discussion

4.1. The *ftt-2* can act as a life span determinant regulator in *C. elegans*

Because of a reported lethal phenotype for both *ftt-1* and *ftt-2* loss-of-function mutants (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006; Li et al., 2007), we used RNAi in an attempt to investigate the *C. elegans* 14-3-3 gene homolog involvement in life span regulation. The RNAi experiments described in our study allowed us to analyze developmental as well as post-developmental *ftt*-dependent modulation of various *C. elegans* life history traits.

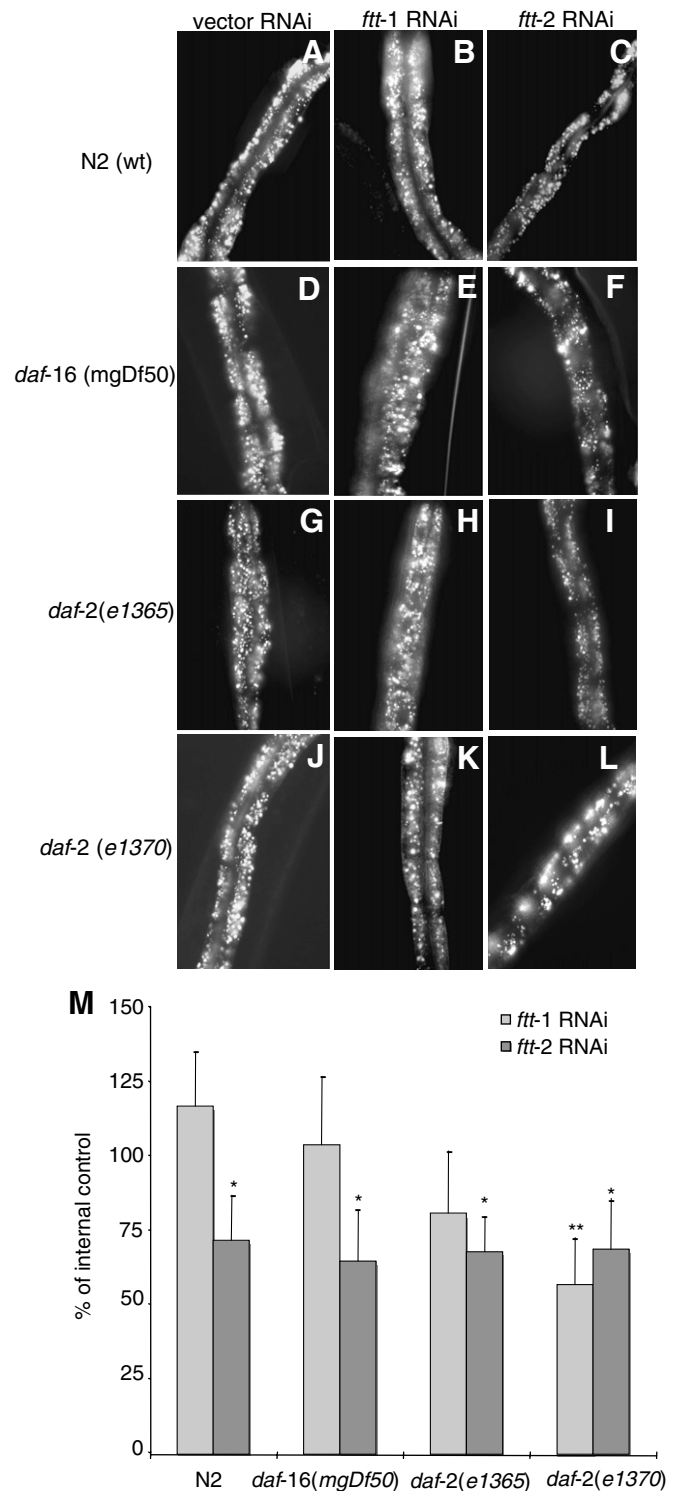


Fig. 8. *ftt-2* can positively modulate lipid droplet reserves. (A–L) Worms of indicated genotype were allowed to hatch on bacteria carrying either control RNAi vector, *ftt-1* or *ftt-2* RNAi at 22.5 °C together with Nile red lipid staining until young adult stage. Pictures were taken at 400× magnification for 200 ms by fluorescence microscopy as described in Section 2. (M) Lipid droplet quantification reveals a highly significant reduction of lipid content in *daf-16(mgDf50)* loss-of-function mutant upon *ftt-2* RNAi knock down only. Quantifications of Nile red lipid staining were done by fluorescence microscopy as described in Section 2 on at least ten animals. Bars represent the standard error (SEM) and mean values are expressed after normalization with respective control RNAi, which represent 100%. Statistical Student's *t*-test comparison between *ftt* RNAi and respective control where *p*-value <0.05 and ****p*-value <0.005 gives the following results for *ftt-2*: **p* = 0.02 for Wild type; **p* = 0.03 for *daf-2(e1370)*; **p* = 0.009 for *daf-2(e1365)*; **p* = 0.05 for *daf-16(mgDf50)* and for *ftt-1*: *p* = 0.26 for Wild type; ****p* = 0.0009 for *daf-2(e1370)*; *p* = 0.18 for *daf-2(e1365)*; *p* = 0.77 for *daf-16(mgDf50)*.

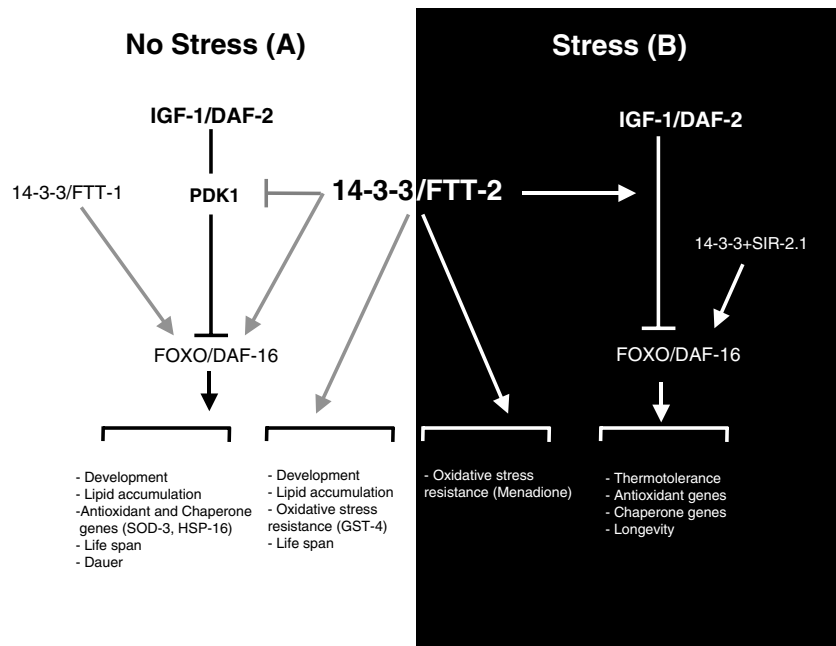


Fig. 9. A model depicting the involvement of 14-3-3 in DAF-16-dependent and -independent mechanisms regulating normal life span and acute stress response in *C. elegans*. We propose a two component model in which 14-3-3 can modulate (A) no stress and (B) stress-dependent physiological responses. (A) In non-stress conditions, 14-3-3 is permanently at work to modulate physiological traits in a DAF-2-dependent manner and we show that PDK1 is a target for 14-3-3 regulation. We demonstrate in this work that 14-3-3 can also modulate physiological traits by acting independently of DAF-16. (B) In stress conditions, we show that 14-3-3 promotes oxidative stress resistance in a DAF-16-independent manner. Moreover, our work demonstrates that 14-3-3 can modulate thermotolerance by a DAF-2/DAF-16-dependent mechanism introducing a new side regulatory stress-responsive pathway element to the one already described by Berdichevsky et al. (2006).

We report here that *ftt-2* is a more potent life span modulator in all of the *C. elegans* genetic backgrounds that we assessed as well as in a closer worm species such as *Caenorhabditis briggsae* (Araiz and Galas, personal communication). As previously proposed in other reports (Cahill et al., 2001; Berdichevsky et al., 2006), the *C. elegans* *ftt* genes can promote cytoplasmic retention of phosphorylated DAF-16 but can also mediate activation of a 14-3-3/SIR-2.1/DAF-16 stress-mediated-dependent pathway to elicit stress resistance and life span extension. Here we show that *ftt-2* can promote *C. elegans* life span in stress-free conditions. Moreover, we show for the first time the existence of two action levels of *ftt-2* (as well as for *ftt-1*) for life span modulation. Thus, while *ftt-2* gene knock out by RNAi can induce side morphological problems (protruding vulva or bagging phenotype, as also reported elsewhere (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006)), together with a strong life span shortening, the same RNAi induction only during the post-developmental period induces a highly significant life span shortening without morphological side effects. We also demonstrate here the specificity of *ftt-1* and *ftt-2* RNAi induction by the observation of non-overlapping induced phenotypes.

In summary we show here that *ftt-2*, and to a lesser extent the *ftt-1*, can positively modulate the life expectancy during worm adulthood by acting at developmental stages only. This mechanism may reflect the 14-3-3 pleiotropic effects on worm signalling systems because both *daf-2* class mutants assessed in our RNAi knock down experiments appeared to be modulated to the same relative extent difference as the control. We also report in this work that *ftt-2* can promote worm life span throughout a negative modulation of the *pdk-1* while *ftt-1* does not. However, we show here that *daf-2* class 2 mutants are more prone to *ftt-2* modulation for life span than *daf-2* class 1 mutant alleles during adulthood. Previous reports (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005) have shown that *daf-2* class 2 mutant alleles are genetically characterised by a greater loss of PI3kinase signalling, which reflects multiple signal outputs from the DAF-2 receptor. It is possible to conclude that

main effect on life span by *ftt-2* is mediated by this transduction pathway (as depicted in Fig. 9) because of a *pdk-1* requirement as revealed by our experiments. Altogether, the experiments described here demonstrate for the first time a *ftt-2* (as well as *ftt-1*) life span different modulation in both *daf-2* class 1 and class 2 mutants.

4.2. *ftt-2* can modulate life span in a *daf-16* null genetic background

In this report, we show that *daf-16* loss-of-function mutant retains a *ftt-2* but not *ftt-1*-dependent life span modulation (Fig. 9). This result indicates that additional mechanisms can regulate worm life span in a *daf-16*-independent but *ftt-2*-dependent manner. Moreover, we show for both *daf-2* class mutants assessed in this work, that *ftt-2* RNAi only during developmental life history period can also exert a deleterious effect on worm life span.

Previous reports introduced that SIR-2.1, a *C. elegans* NAD-dependent deacetylase homolog, can interact with FTT-1 and FTT-2 proteins to activate DAF-16 and extend the life span of stressed worms only (Wang et al., 2006; Berdichevsky et al., 2006; Li et al., 2007 and Fig. 8). Moreover, these reports showed that *sir-2.1* or *ftt-1* and *ftt-2* were not required for life span extension during reduced DAF-2/IGF-1 signalling although such studies only assessed one *daf-2* class mutant. We demonstrate here the existence of a new regulatory mechanism involving the *ftt-2* gene and acting via *daf-16* and the DAF-2/IGF-1 pathway together with another yet unknown *daf-16*-independent process for normal life span modulation, stress resistance and metabolism regulation (Fig. 8). Because previous studies did not assess for the FTT-2/Sir-2.1/DAF-16 stoichiometric regulatory complex and because it is always possible that cytoplasmic retention of DAF-16 upon *ftt-2* RNAi does not reflect the fate of the whole DAF-16 cellular pool, this new *ftt-2* target pathway may use part of the FTT-2 protein pool to regulate life span in a *daf-16*-independent manner.

4.3. Dauer formation and lipid accumulation can be modulated by *ftt-2* knock down

It has been reported that dauer formation regulation of *daf-2* class 1 mutant occurs mainly via a parallel pathway from the *daf-2/age-1/daf-16* pathway (Gems et al., 1998; Nanji et al., 2005). However we show here that dauer commitment of both *daf-2* class mutants is greatly enhanced when *ftt-2* is targeted by RNAi while *ftt-1* RNAi produces no detectable effect.

Because we show that *daf-2* class 2 allele mutants are more prone to positive life span regulation by *ftt-2* than class 1 mutant allele and because we show that dauer induction upon *ftt-2* RNAi can be greatly enhanced in *daf-2* class 1 mutant, we propose that an alternative *daf-2/daf-16* pathway is more prone to *ftt-2* regulation for dauer formation but not for life span modulation. Moreover, because lipid droplet accumulation is a well-reported accompanying metabolic phenotype of worm dauer induction as well as in dauer constitutive phenotypes, we demonstrate here that *ftt-2* must be unexpectedly involved in promoting lipid droplet accumulation together with a negative influence on dauer commitment while *ftt-1* is not involved in dauer commitment regulation but only for lipid accumulation in *daf-2* class 2 mutant.

4.4. *ftt-2* can modulate worm stress resistance responses during adulthood period

We reveal here that *ftt-2* promotes stress resistance by both *daf-2*-dependent and *daf-16*-independent processes. We also show that this effect is correlated with the up-regulation of a subset of *daf-16* target genes that have been involved in stress resistance. However, because our experiments were done in stress-free conditions, we can conclude here for a positive modulation by *ftt-2* in promoting stress-responsive genes. Moreover, we also demonstrate that *ftt-2* gene can promote the up-regulation of DAF-16 target genes that have been involved in stress resistance. We also demonstrate by two independent observations (heat-shock assay and HSP-16::GFP expression) that heat-shock-responsive gene expression is not modulated by *ftt-2* thereby providing new insights into the fine-tuning regulations of DAF-16 molecular targets. Such fine tuned regulations may use the new emerging family of FOXO/DAF-16 cofactors that can account for simultaneous *daf-16*-dependent and -independent processes regulating life span programs in stress conditions in *C. elegans* (Berdichevsky and Guarente, 2006).

In conclusion, this study demonstrates, for the first time, the ability of the *C. elegans* 14-3-3 genes to modulate the life expectancy during adulthood even in a stress-free environment.

The new modulation properties on the various physiological traits assessed in this work (Fig. 9) yet extend the involvement of 14-3-3-dependent regulations from short time events, such as the one counteracting the danger of sudden darkness in plants (Mackintosh, 2004) or acute stress response in *C. elegans* to a more sustained event such as normal life span regulation.

Acknowledgments

We thank Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis elegans* Genetics Center for providing strains. We are grateful to Donald L. Riddle for the *daf-2(e1365)* strain and Diane Shake for kindly providing us with the 14-3-3/*ftt* cDNA clones. We are especially grateful to MRI (www.mri.cnrs.fr) and its technical assistance. We thank Julia Pfitzner, Victoria Malchin, Nga Nguyen and Professor Ulrich Mok, from Lise-Meitner-Oberstufenzentrum, Berlin, Germany, for technical assistance. We thank Dr. May Morris, Dr. Jean Michel Bellanger and Dr. Andrew Burgess for critical reading of the manuscript. We thank Dr. Anne Blangy for helpful with qPCR experi-

ments. This work was supported by the CNRS, C. Araiz is a Ph.D. fellow of AFM (www.afm-france.org) and ARC (www.arc.asso.fr/).

References

- Baxter, C.J., Redestig, H., Schauer, N., Reipsilber, D., Patil, K.R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., 2007. The metabolic response of heterotrophic arabidopsis cells to oxidative stress. *Plant Physiol.* 143, 312–325.
- Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., Guarente, L., 2006. *C. elegans* SIR-2.2 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 125, 1165–1177.
- Berdichevsky, A., Guarente, L., 2006. A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. *Cell Cycle* 5, 2588–2591.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Cahill, C.M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., Alexander-Bridges, M., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 13402–13410.
- Craparo, A., Freund, R., Gustafson, T.A., 1997. 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate in a phospho-serine dependent manner. *J. Biol. Chem.* 272, 11663–11669.
- Dillin, A., Crawford, D.K., Kenyon, C., 2002a. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science* 298, 830–834.
- Dillin, A., Hsu, A.L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C., 2002b. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298, 2398–2401.
- Dong, M.Q., Venable, J.D., Au, N., Xu, T., Park, S.K., Cociorva, D., Johnson, J.R., Dillin, A., Yates 3rd, J.R., 2007. Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science* 317, 660–663.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Larson, P.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M., Riddle, D.L., 1998. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150, 129–155.
- Henderson, S.T., Johnson, T.E., 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11, 1975–1980.
- Henderson, S.T., Bonafe, M., Johnson, T.E., 2006. *daf-16* protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 444–4460.
- Honda, Y., Honda, S., 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385–1393.
- Hsu, A.L., Murphy, C.T., Kenyon, C., 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142–1145.
- Kenyon, C., 2005. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449–460.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G., 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942–946.
- Klass, M., Hirsh, D., 1976. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 260, 523–525.
- Lee, S.S., Lee, R.Y., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G., 2003a. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* 33, 40–48.
- Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., Ruvkun, G., 2003b. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300, 644–647.
- Leiers, B., Kampkotter, A., Grevelding, C.G., Link, C.D., Johnson, T.E., Henkle-Duhrsen, K., 2003. Stress-responsive glutathione S-Forkhead confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1405–1415.
- Libina, N., Berman, J.R., Kenyon, C., 2003. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115, 489–502.
- Li, J., Tewari, M., Vidal, M., Lee, S.S., 2007. The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 301, 82–91.
- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., Kenyon, C., 1997. *daf-16*: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319–1322.
- Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C., 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139–145.
- Link, C.D., Johnson, C.J., 2002. Reporter transgenes for study of oxidant stress in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* 353, 497–505.
- Lithgow, G.J., White, T.M., Melow, S., Johnson, T.E., 1995. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7540–7544.
- Mackintosh, C., 2004. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* 381, 329–342.
- McElwee, J., Bubb, K., Thomas, J.H., 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2, 111–121.

- McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thornton, J., Gems, D., 2006. Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived *daf-2* mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 127, 458–472.
- Mitchell, D.H., Stiles, J.W., Santelli, J., Sanadi, D.R., 1979. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J. Gerontol.* 34, 28–36.
- Morley, J.F., Morimoto, R.I., 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* 15, 657–664.
- Morton, D.G., Shakes, D.C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A., Kempthues, K.J., 2002. The *Caenorhabditis elegans* *par-5* gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev. Biol.* 241, 47–58.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277–283.
- Nanji, M., Hopper, N.A., Gems, D., 2005. LET-60 modulates effects of insulin/IGF-1 signaling on development and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4, 235–245.
- Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Dixit, B.L., Raha, T., Green, M.R., Tissenbaum, H.A., 2006. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* 38, 251–257.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G., 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994–999.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T., 2002. Regulation of kinase activity of 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 by binding to 14-3-3. *J. Biol. Chem.* 277, 39360–39367.
- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S., 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1387–1404.
- Van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., Van Heusden, G.P., 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23, 936–946.
- Walker, G.A., Lithgow, G.J., 2003. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* 2, 131–139.
- Wang, W., Shakes, D.C., 1997. Expression patterns and transcript processing of *ftt-1* and *ftt-2*, two *C. elegans* 14-3-3 homologues. *J. Mol. Biol.* 268, 619–630.
- Wang, W., Shakes, D.C., 1994. Isolation and sequence analysis of a *Caenorhabditis elegans* cDNA which encodes a 14-3-3 homologue. *Gene* 147, 215–218.
- Wang, J., Kim, S.K., 2003. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130, 1621–1634.
- Wang, Y., Wook Oh, S., Deplancke, B., Luo, J., Walhout, A.J.M., Tissenbaum, H.A., 2006. *C. elegans* 14-3-3 proteins regulates life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* 127, 741–747.
- Zadzinski, R., Fortuniak, A., Bilinski, T., Grey, M., Bartosz, G., 1998. Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44, 747–759.

Ce travail a permis de mettre en évidence des fonctions communes aux deux protéines 14-3-3 de *C. elegans*, FTT-1 et FTT-2, ainsi que des fonctions spécifiques pour FTT-2.

FTT-1 et FTT-2 contribuent toutes deux à la séquestration cytoplasmique de DAF-16.

Elles régulent positivement la longévité et le stockage lipidique en agissant sur la voie DAF-2/Ins/IGF-1/DAF-16.

Elles exercent un effet positif sur le rythme de développement des animaux à travers deux mécanismes différents, l'un mettant en jeu la voie DAF-2/Ins/IGF-1/DAF-16 et l'autre indépendant de DAF-16.

Suite à un stress thermique, FTT-1 et FTT-2 activent les défenses permettant la survie face à ce stress de façon dépendante de la voie DAF-2/Ins/IGF-1/DAF-16. Lors d'un stress oxydant, FTT-1 et FTT-2 participent aussi positivement à la réponse contre ce stress, mais indépendamment de DAF-16.

Bien que les deux protéines FTT régulent ces différents aspects, la contribution de FTT-2 dans chacun des phénotypes observés apparaît systématiquement prépondérante.

De plus, FTT-2 présente des fonctions qui lui sont spécifiques : FTT-2 inhibe partiellement la formation des larves dauers, phénotype à nouveau lié à la voie DAF-2/Ins/IGF-1/DAF-16 ; FTT-2 réprime l'expression basale de gènes de réponse au stress, régulés par cette voie mais également de gènes qui ne sont pas sous l'influence de DAF-16.

Enfin, FTT-2 semble promouvoir la longévité et le stockage lipidique indépendamment de l'intervention de DAF-16.

La mise en évidence de la participation des protéines FTT à la régulation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 afin de promouvoir la longévité de *C. elegans* est une donnée nouvelle, de même que la contribution de FTT-2 à un mécanisme régulant la longévité sans l'intervention de DAF-16. Les résultats de cette étude illustrent la complexité des fonctions des protéines FTT et leur participation à de nombreux mécanismes important dans la survie de *C. elegans*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Peu de choses étaient connues sur l'implication des protéines FTT dans la régulation de la longévité chez *C. elegans* jusqu'à ce que deux études récentes rapportent une modulation positive de la durée de vie du ver par les protéines FTT, via un mécanisme indépendant de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Elles ont mis en évidence une coopération entre les protéines FTT, SIR-2.1 et DAF-16 permettant de promouvoir la longévité et la résistance des animaux, dans des conditions de stress ou considérées comme équivalentes (surexpression de *sir-2.1*) [295, 384]. Une troisième étude a déterminé le rôle des protéines FTT dans la formation des larves dauers et a montré l'intervention de FTT-2 dans la voie DAF-2/Ins/IGF-1 [385].

Le travail réalisé au cours de mon doctorat a permis, en outre, de démontrer que les protéines FTT influencent la longévité et la résistance au stress, d'une part en participant à la régulation de nombreuses fonctions métaboliques, contrôlées ou non par DAF-16 et d'autre part, en interagissant avec la voie DAF-2/Ins/IGF-1 en amont de son effecteur majeur, DAF-16.

I. Régulation de la longévité de *C. elegans* par FTT-1 et FTT-2 lors de la période post-reproductive.

I. 1. Régulation positive de la longévité.

De façon cohérente avec la littérature, nous avons montré que FTT-1 et FTT-2 sont responsables de la séquestration cytoplasmique de DAF-16 lorsqu'il est sous forme inactive, c'est à dire phosphorylé par AKT et donc incapable d'activer la transcription de ses gènes cibles. Cependant, nos expériences de longévité ont permis d'attribuer une fonction positive à FTT-2, et dans une moindre mesure à FTT-1, dans la régulation de la durée de vie des animaux sous la dépendance de DAF-16 (voir article figure 2). Nos résultats indiquent donc que les protéines FTT jouent des rôles antagonistes dans la régulation de DAF-16. Ces effets opposés peuvent s'expliquer par l'implication des protéines FTT dans la régulation négative d'autres cibles au sein de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, la « somme » de ces modulations résultant au final en une longévité accrue. Cette hypothèse est confortée par les résultats que nous avons obtenus à l'aide de mutants *pdk-1* soumis à un traitement RNAi dirigé contre *ftt-2* (voir article figure 2 E et F). De plus, chez les mammifères, le récepteur IGF-1 et la protéine IRS (« insulin receptor substrate ») sont des cibles connues des protéines 14-3-3 [386, 391] et la PI-3 kinase interagit avec les protéines 14-3-3 *in cellulo* [392]. Il est donc hautement probable que les protéines équivalentes chez *C. elegans* (DAF-2, IST-1 et AGE-1,

respectivement) puissent interagir avec FTT-1 ou FTT-2. Des expériences d'immunoprécipitation de DAF-2, IST-1 et AGE-1 suivies d'une détection des protéines FTT par les anticorps appropriés pourraient être envisagées ultérieurement afin de démontrer la validité de ces interactions. De façon plus globale, une recherche systématique de la présence du motif de liaison aux protéines FTT sur tous les composants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 serait utile pour l'identification des cibles potentielles de la régulation de cette voie par FTT-1 ou FTT-2.

I. 2. Régulation positive de la longévité de mutants portant un allèle nul de *daf-16*.

A côté de l'effet positif inattendu des protéines FTT dans la régulation de la longévité, un autre résultat surprenant réside dans l'implication spécifique de FTT-2 dans un mécanisme indépendant de DAF-16 (voir article figure 2B). En effet, nous avons montré un raccourcissement de la durée de vie des mutants *daf-16* adultes sous RNAi *ftt-2*, ce qui suggère un mécanisme additionnel de régulation de la longévité, indépendant de DAF-16, mais nécessitant la contribution spécifique de FTT-2. Ce résultat est en contradiction avec ceux rapportés par Berdichevsky *et al.* qui ne montrent aucune variation de la longévité de ces mutants soumis au RNAi *ftt-2* [295]. Cette divergence peut s'expliquer au moins de deux façons: nous n'utilisons pas les mêmes constructions pour le RNAi *ftt-2* (ni pour le RNAi *ftt-1*), ce qui peut résulter en une efficacité variable de la diminution de l'expression du gène *ftt-2* entre les deux études. Nos expériences de PCR quantitative ont déterminé une diminution de plus de 50% du niveau d'ARN messager de *ftt-2* en réponse au traitement RNAi correspondant, tandis que l'efficacité du RNAi *ftt-2* n'a pas été évaluée dans l'étude de Berdichevsky *et al.*. De plus, l'objectif de nos expériences de RNAi contre *ftt-2* appliquées à la longévité des mutants déficients pour *daf-16*, était de vérifier si l'action positive de FTT-1 et de FTT-2 sur la longévité du nématode était bien sous la dépendance de DAF-16 ; pour cela, nous avons utilisé un effectif de près de cinq cents animaux. L'expérience menée par Berdichevsky *et al.* avait un tout autre but : il s'agissait d'écarter la possibilité que les vers sauvages soumis au RNAi *ftt-2*, soient en réalité malades et présentent une longévité réduite, non spécifique du traitement. Les auteurs ont donc testé l'effet du RNAi *ftt-2* sur moins de cent mutants *daf-16* perte de fonction [295]. Nous postulons que l'observation d'un plus grand nombre d'animaux nous a permis de révéler un effet inattendu, faible mais non négligeable, puisqu'il s'est révélé hautement significatif après analyse statistique. Ainsi, une certaine proportion de protéines FTT-2 participerait de façon mineure à un mécanisme de régulation de la longévité qui ne requiert pas DAF-16. Les protéines de la famille 14-3-3

interagissant avec de nombreux partenaires, il n'est pas très étonnant qu'une des protéines FTT de *C. elegans*, en l'occurrence FTT-2, intervienne dans d'autres voies de signalisation que DAF-2/Ins/IGF-1 pour réguler la longévité.

Des publications récentes ont montré l'implication de protéines-clé de la traduction des ARN messagers (IFE-2, IFE-1 et RSKS-1) dans la régulation du vieillissement de *C. elegans*, de façon indépendante de DAF-16 [132, 228] (voir paragraphe II. 3. 4.). Il serait intéressant d'envisager des expériences d'immuno-précipitation afin de vérifier si FTT-2 interagit physiquement avec ces protéines. De plus, des expériences de RNAi *ftt-2* appliquées aux mutants perte de fonction des gènes *ife-2*, *ife-1* ou *rsk-1*, permettraient de déterminer si FTT-2 influence leur effet bénéfique sur la longévité et participe à la régulation indépendante de DAF-16 ; à l'inverse, des expériences de RNAi contre ces régulateurs dans un contexte de surexpression de *ftt-1* ou de *ftt-2* permettrait de vérifier s'ils participent à l'extension de longévité des animaux transgéniques [384].

I. 3. Régulation de l'expression basale de gènes de défense contre le stress et régulation de la résistance au stress par les protéines FTT.

I. 3. 1. Stress oxydant.

Nos résultats montrent que seul FTT-2 participe à la régulation de l'expression basale de gènes de défense contre le stress oxydant (voir article figure 4). En effet, en l'absence de stress, FTT-2 inhibe fortement l'expression de la superoxyde dismutase *sod-3*, cible connue de DAF-16 [279], ainsi que plus modérément, celle de la glutathione-S-transférase *gst-4* qui n'est pas une cible transcriptionnelle de DAF-16 [128]. Ainsi, lors du vieillissement normal de *C. elegans*, FTT-2 participe à la répression de gènes de défense contre le stress oxydant par deux mécanismes, l'un dépendant et l'autre indépendant de DAF-16.

En revanche, en conditions de stress oxydant, FTT-2 contribue à la survie des animaux via une régulation positive de la réponse à ce stress (voir article figure 5). De plus, FTT-1, qui n'est pas impliqué dans la régulation de l'expression basale de *sod-3* et *gst-4*, y contribue de la même façon. La régulation exercée par les protéines FTT, agissant en sens opposé en fonction des conditions environnementales (normales *versus* génératrices de stress) pourrait être expliquée par le modèle présenté par Berdichevsky *et al.* [295] (voir paragraphe III. 5. 2. et Figure 19).

Les auteurs proposent qu'en conditions normales les protéines FTT séquestrent DAF-16 dans le cytoplasme, l'empêchant d'activer ses gènes cibles. Par contre, lors d'un stress, les protéines FTT permettent l'interaction de DAF-16 avec SIR-2.1 et le complexe ternaire ainsi formé active la transcription de gènes augmentant la longévité et la résistance au stress. Les protéines FTT passent donc d'une fonction inhibitrice à une fonction activatrice suite à un changement de conditions. Un mécanisme apparenté est probablement à l'origine de l'inversion du rôle des protéines FTT (en particulier FTT-2) que nous observons : régulation négative de l'expression basale des défenses contre le stress oxydant en conditions normales *versus* régulation positive de la réponse au stress oxydant lors d'une exposition à la ménadione, à la différence près que nous montrons que cette dernière se fait indépendamment de DAF-16. Ainsi, nos données suggèrent fortement l'implication d'un autre facteur de transcription dans ce nouveau mécanisme de régulation. Parmi les facteurs identifiés à ce jour, SKN-1 constitue un candidat de choix pour remplir cette fonction. En effet, SKN-1 intervient au même niveau que DAF-16 en aval de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, les deux facteurs de transcription possédant des fonctions communes et distinctes dans la régulation de la longévité et de la résistance au stress [148]. Ils interviennent notamment ensemble dans la régulation de *sod-3*, alors que *gst-4* est spécifiquement ciblé par SKN-1. L'implication des protéines FTT, et plus particulièrement de FTT-2, dans la régulation de SKN-1 pourrait en partie expliquer leurs fonctions indépendantes de DAF-16, aussi bien en ce qui concerne la résistance au stress oxydant que la longévité.

Par ailleurs, il a été montré que BAR-1, orthologue de la β caténine, interagit avec DAF-16 en réponse à un stress oxydant, pour induire l'expression du gène *sod-3* et que cette action est indépendante de sa fonction dans la voie Wnt [297]; la revue de Berdichevsky *et al.* [89] propose que cette interaction est possible après libération de DAF-16 par les protéines FTT, mais aucune preuve expérimentale de ce mécanisme n'a été mise en évidence. Or, une recherche sur la base de donnée BioGRID (The Biological General Repository for Interaction Datasets, <http://www.thebiogrid.org>) nous a indiqué qu'une interaction génétique entre *bar-1* et *ftt-2* avait été mise en évidence lors d'un crible RNAi [393] ; de même, la base de données Wormbase (<http://www.wormbase.org>) mentionne qu'une autre étude d'interactions génétiques montre l'interaction entre *bar-1* et *ftt-1* [394]. D'une part, il serait intéressant de s'assurer de l'existence d'une interaction physique entre BAR-1 et chacune des protéines FTT par des expériences d'immuno-précipitation en conditions de stress oxydant ; et d'autre part, de déterminer si les complexes BAR-1/FTT-1 et BAR-1/FTT-2 pourraient interagir avec SKN-1 pour induire la résistance au stress oxydant telle que nous l'avons mise en évidence, c'est à dire, impliquant les protéines FTT et indépendante de DAF-16, que nous avons mise

en évidence. Des expériences d'immuno-précipitation seraient à nouveau nécessaires pour vérifier la formation d'un éventuel complexe ternaire lors d'une exposition à la ménadione. De plus, un RNAi à l'encontre de *ftt-1*, *ftt-2* ou de *bar-1* appliqué à des animaux surexprimant SKN-1 et traités à la ménadione, nous permettraient de tester si les protéines correspondantes sont impliquées dans l'augmentation de la résistance au stress oxydant de ces animaux [147].

En complément, des animaux déficients pour DAF-16 (souche GR1307 (*daf-16(mgDf50)*)) croisés au préalable avec des animaux portant le transgène *sod-3::GFP* (souche CF1553), pourraient être soumis alternativement au RNAi contre *ftt-1*, *ftt-2* ou *bar-1*, puis exposés à la ménadione. Cette expérience nous renseignerait quant à l'implication des protéines correspondantes dans la régulation de l'expression de *sod-3::GFP* par SKN-1 lors d'un stress oxydant, et ce, sans l'intervention de DAF-16.

I. 3. 2. Stress thermique.

Par ailleurs, nos résultats indiquent qu'aucune des deux protéines FTT n'intervient dans la régulation de l'expression de la protéine de choc thermique HSP-16, une autre cible de DAF-16, dans des conditions normales chez des animaux sauvages (voir article figure 4).

Pourtant, suite à un stress thermique, FTT-1 et FTT-2 sont impliquées dans la survie des mutants *daf-2* hypomorphes (voir article figure 3B et C). Il est connu que les mutants *daf-2* perte de fonction développent une tolérance thermique accrue par rapport aux animaux sauvages, cette propriété étant désignée sous le nom de phénotype *itt* pour *intrinsic thermotolerance* [94]. Cette caractéristique dépend de l'activité de DAF-16 [274], qui coopère avec le facteur de transcription HSF-1 pour activer la transcription des gènes codant pour les protéines de stress thermique HSP [95]. Nous avons montré que les protéines FTT participent au phénotype *itt* des mutants *daf-2*, alors qu'elles n'affectent pas la résistance au stress thermique des animaux sauvages. Cette différence peut être due à l'exacerbation, chez les mutants *daf-2* hypomorphes, du mécanisme auquel les protéines FTT participent pour réguler la résistance au stress thermique ; en effet, ces animaux sont considérés comme « génétiquement stressés » en raison de la forte activité de DAF-16, il est possible qu'en dessous d'un certain seuil d'activation de DAF-16 (cas des animaux sauvages soumis à un stress thermique), l'implication des protéines FTT dans la réponse à ce stress existe mais ne puisse pas être détectée à travers l'observation de la survie de ces animaux. C'est pourquoi un fond génétique *daf-2* perte de fonction est plus adapté, car plus sensible, à la mise en évidence de mécanismes de régulation de la résistance au stress soumis à l'influence des protéines FTT

et de la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Une approche biochimique offrirait sans doute une sensibilité suffisante pour permettre de révéler la participation des protéines FTT dans ce type de régulation, chez des animaux sauvages.

De manière schématique, nous avons observé que la régulation par les protéines FTT, et en particulier par FTT-2, des mécanismes liés à la survie est inversée lors de l'exposition à un stress par rapport aux conditions normales, quelque soit l'implication de DAF-16. Il est connu que DAF-16 subit des phosphorylations inhibitrices par AKT sur quatre résidus sérine/thréonine et que ces sites permettent la liaison des protéines 14-3-3 de mammifères [354, 386] et par extension des protéines FTT. Ainsi, elles peuvent séquestrer le facteur de transcription dans le cytoplasme, probablement en masquant sa séquence d'import nucléaire, comme c'est le cas pour Forkhead chez les mammifères [389]. Il est également montré que lors d'un stress, DAF-16 est au contraire la cible de phosphorylations activatrices par diverses kinases (JNK-1, AMPK, CST-1, P38 MAPK...) sur des sites différents de ceux phosphorylés par AKT [109, 287-289]. Le fait que les protéines FTT soient impliquées de façon positive dans la réponse au stress, ainsi que nous l'avons montré, et soient présentes au sein d'un complexe nucléaire transcriptionnellement actif, comme rapporté par Berdichevsky *et al.* [295], suggère qu'elles peuvent probablement reconnaître les sites phosphorylés par les kinases activatrices. Il est en effet possible d'imaginer que les protéines FTT aient la capacité de se lier à DAF-16 par l'intermédiaire de motifs autres que ceux phosphorylés par AKT et que cette interaction ne modifie pas la présentation de la séquence d'adressage nucléaire et permette en outre de stabiliser le complexe transcriptionnel ; cette hypothèse expliquerait que les protéines FTT puissent d'une part, interagir avec DAF-16 actif dans le noyau et d'autre part, jouer un rôle positif dans la résistance au stress en potentialisant l'action de DAF-16. Dans le cas de la réponse à l'exposition à la ménadione, n'impliquant pas DAF-16, le même raisonnement peut être suivi et appliqué à un autre facteur de transcription. Il serait donc intéressant de caractériser l'interaction biochimique entre DAF-16 et les protéines FTT en conditions de stress en s'affranchissant de la phosphorylation potentielle par AKT, par l'utilisation de mutants DAF-16 non phosphorylables par cette kinase. Chez ces animaux, disponibles au Caenorhabditis Genetic Center, les résidus sérine/thréonine des quatre sites de reconnaissance par AKT ont été mutés en résidus alanine (T54A, S240A, T242A, S314A), rendant donc l'inhibition de DAF-16 par AKT irréalisable. Il a été montré que chez ces mutants, DAF-16 s'accumule dans le noyau mais que cette localisation préférentielle ne suffit pas à promouvoir la formation constitutive de dauers ou à prolonger la durée de vie de l'animal [251, 276] ; ce qui suggère la persistance d'une inhibition additionnelle et/ou la

nécessité d'une phosphorylation activatrice de DAF-16 pour permettre la régulation de ses gènes cibles. Par conséquent, la détermination des sites reconnus par les différentes kinases activatrices grâce à des tests de phosphorylation *in vitro* réalisés sur des mutants ponctuels de DAF-16, suivie d'un éventuel recoupement avec les motifs de liaison aux protéines FTT constituerait une approche de choix, apte à définir les modalités d'interaction s'opérant entre DAF-16 et les protéines FTT.

I. 4. Régulation positive et différentielle de la longévité de mutants *daf-2* hypomorphes de classes alléliques différentes.

Nous avons montré l'implication des protéines FTT dans la régulation de DAF-16 pour médier la longévité à travers la voie DAF-2/Ins/IGF-1. Grâce à l'utilisation de mutants *daf-2* hypomorphes de classes alléliques différentes, qui empruntent des voies intermédiaires différentes émergeant du récepteur DAF-2 et convergeant vers DAF-16 [255, 265], nous avons pu mettre en évidence que l'influence des protéines FTT, et surtout celle de FTT-2, est plus importante sur la voie DAF-2/AGE-1/DAF-16, majoritairement utilisée par les mutants de classe 2 (*daf-2(e1370)*), que sur la voie parallèle, potentiellement la voie LET-60, utilisée préférentiellement par les mutants *daf-2* de classe 1 (*daf-2(e1365)*) (voir article figure 2C et D). De façon cohérente, nous avons montré que PDK-1, qui se positionne entre AGE-1 et DAF-16 est préférentiellement régulé par FTT-2 (voir article figure 2E et F), suggérant que FTT-1 agit sur un autre composant de la voie DAF-2/AGE-1/DAF-16. Cependant, nos résultats sur les mutants *pdk-1* perte de fonction indiquent également que FTT-1 est impliqué dans une régulation négative de la longévité, alors que par ailleurs nous avons observé une régulation opposée, dans des fonds génétiques sauvage et *daf-2* perte de fonction. Une possibilité serait que cette contribution mineure ait été masquée par la régulation positive impliquant FTT-1, prépondérante dans ces deux contextes génétiques. L'absence d'effet du RNAi *ftt-1*, que nous avons montrée sur des mutants *pdk-1* gain de fonction, nous permet de valider cette hypothèse (voir article figure 2F).

En ce qui concerne l'influence de FTT-2 sur la régulation de PDK-1, nous avons pu observer qu'elle est négative. Nous montrons donc que FTT-2 régule de façon « conflictuelle » la voie DAF-2/Ins/IGF-1 en ciblant au moins deux composants de cette voie: d'une part, FTT-2 régule négativement PDK-1, et lève donc l'inhibition qu'impose, en aval, cette kinase sur DAF-16, ce qui est en faveur d'une augmentation de la longévité ; d'autre part, hors conditions de stress, FTT-2 séquestre DAF-16 dans le cytoplasme, ce qui favorise

une réduction de la longévité. Puisque la somme des effets observés résulte en une régulation positive de la longévité des animaux sauvages, il est tentant de proposer que FTT-2 exerce une influence prédominante sur PDK-1, au détriment de son action sur DAF-16. Les résultats obtenus sur les mutants *pdk-1* gain de fonction laissent à penser que c'est le cas. Cependant, cette hypothèse doit avant tout être étayée par une caractérisation biochimique de la stoechiométrie des complexes PDK-1/FTT-2 et DAF-16/FTT-2. Par ailleurs, elle ne tient pas compte des autres cibles potentielles de FTT-2 dans la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dont l'influence pourrait être révélée par des expériences de longévité réalisées sous RNAi *ftt-2*, dans le contexte d'une double perte de fonction, à l'aide de mutants *pdk-1* ; *daf-16*. Il semble toutefois cohérent de postuler que l'ensemble des régulations négatives, exercées par FTT-2 sur les composants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, concourent à lever la répression imposée à DAF-16 par cette voie et à outrepasser l'action directe de FTT-2 sur la séquestration cytoplasmique de DAF-16, ce qui résulte en une régulation globalement positive de la longévité des animaux sauvages.

En ce qui concerne l'identification de la voie parallèle à DAF-2/AGE-1/DAF-16, majoritairement empruntée par les mutants *daf-2* de classe 1, il a été montré qu'il s'agit probablement de la voie LET-60 [265]. Bien que nous ayons montré que les protéines FTT régulent préférentiellement la voie DAF-2/AGE-1 pour agir sur la longévité, nos résultats sur les mutants *daf-2(e1365)* indiquent néanmoins que la voie qu'empruntent ces animaux est également soumise à l'influence des protéines FTT (voir article figure 2C). Par ailleurs, une interaction génétique a été suggérée entre *ftt-1* et *let-60* [394]. Il serait intéressant de déterminer l'effet d'un RNAi *ftt-1*, mais également d'un RNAi *ftt-2*, sur la longévité d'un mutant gain de fonction pour *let-60* dans un fond génétique *daf-2(e1365)*. Dans ce contexte *daf-2* hypomorphe, l'intervention de la voie LET-60 serait exacerbée (il est connu qu'un gain de fonction *let-60* prolonge la durée de vie maximale des mutants *daf-2* de classe 1 [265]), ce qui faciliterait l'observation des effets exercés par FTT-1 et FTT-2 sur la régulation de cette voie. Par la suite, des expériences de longévité réalisées sous RNAi *ftt* à l'aide de différents mutants gain et réduction de fonction des composants de cette voie (*sem-5*, *sos-1*), nous renseigneraient sur les cibles d'action de FTT-1 et FTT-2 ; les interactions ainsi détectées pourraient ensuite être validées par une approche biochimique.

II. Implication des protéines FTT dans le développement de *C. elegans*.

II. 1. Régulation de la formation des larves dauers et du rythme de développement.

Nous avons montré que FTT-2 inhibe partiellement la formation des larves dauers chez des mutants *daf-2* hypomorphes (voir article figure 6), ce qui peut, à première vue, paraître inattendu, étant donné l'effet opposé qu'exerce FTT-2 sur la longévité de ces mêmes vers adultes. En fait, les phénotypes de longévité et d'entrée en dauer, bien que tous deux régulés par la voie DAF-2/Ins/IGF-1 sont dissociables l'un de l'autre, chacun étant caractérisé par l'action de DAF-16 couplé à des co-facteurs spécifiques [255, 265]. Par conséquent, il est possible que FTT-2 soit impliqué dans la régulation de protéines distinctes en fonction du phénotype à mettre en place et que sa contribution soit différente.

L'utilisation de mutants *daf-2* perte de fonction appartenant à des classes alléliques différentes nous a permis, à nouveau, de mettre en évidence une régulation dépendante de FTT-2 et spécifique d'une classe de mutants *daf-2*. Contrairement à la régulation de la longévité, celle de la formation des larves dauers par FTT-2 s'applique de façon plus prononcée aux mutants de classe 1 (*daf-2(e1365)*). Nous montrons donc que la voie parallèle à DAF-2/AGE-1/DAF-16, *a priori* la voie de LET-60, empruntée par les mutants *daf-2* de classe 1 (*daf-2(e1365)*) est davantage sujette à la régulation par FTT-2 pour contrôler la formation des larves dauers qu'elle ne l'est pour réguler la longévité, et inversement pour les mutants *daf-2* de classe 2 (*daf-2(e1370)*). Il a été rapporté que la voie LET-60 agit de concert avec la voie DAF-2/Ins/IGF-1 pendant le développement ; ainsi, une mutation réduction de fonction de *let-60* contribue à la formation des larves dauers [265]. Des tests conduits sur des doubles mutants *daf-2(e1365) ; let-60(n2021)* réduction de fonction, soumis à des conditions de RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* à 22,5°C dès le stade embryonnaire, contribueraient à mieux définir l'influence des protéines FTT sur cette voie pour contrôler l'arrêt en dauer.

Il faut par ailleurs mentionner que nous n'avons noté aucun arrêt au stade dauer pour des animaux sauvages soumis aux mêmes expériences à 22,5°C et à 25°C. Il est possible que la diminution de l'expression de *ftt-2* que nous obtenons avec le traitement RNAi [395] soit suffisante pour entraîner la formation de larves dauers dans un fond génétique sensible comme celui des mutants *daf-2* hypomorphes, mais pas pour engendrer ce phénotype dans un contexte génétique sauvage. Bien qu'un mutant de délétion pour *ftt-2* soit disponible au Gene Knockout Consortium (<http://www.wormbase.org>), nous ne pouvons pas tester la formation de larves dauers pour cette souche, car elle n'est pas viable sous sa forme homozygote [384]. La seule alternative étant d'avoir recours à la méthode de RNAi comme nous l'avons fait. Il

est toutefois possible d'utiliser la souche NL2099, *rrf-3(pk1426)*, déficiente pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN, ce qui la rend plus sensible au traitement par RNAi [396, 397], y compris au niveau des neurones, connus pour être résistants au RNAi chez *C. elegans* [395, 398]. L'utilisation de cette souche dans des expériences de formation de dauers permettrait de déterminer si les protéines FTT sont également impliquées dans la régulation de ce mécanisme chez les animaux sauvages. D'autre part, il a été montré que l'expression de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans les neurones participe à la formation des dauers [305]. Il serait intéressant de tester l'effet d'un RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* spécifiquement au niveau des neurones afin de déterminer si les protéines FTT sont engagées dans la régulation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans ces cellules pour entraîner le phénotype dauer; cette expérience est possible grâce à l'utilisation de la souche mutante WM27 pour le gène *rde-1* (« RNAi defective » ; dans laquelle le processus de RNAi ne fonctionne pas), dans laquelle on réintroduit *rde-1* sauvage sous le contrôle d'un promoteur neuronal, celui du gène *unc-119* par exemple. Dans ces conditions, un traitement RNAi *ftt* cible spécifiquement les neurones. Il est également envisageable de réaliser une manipulation identique dans un contexte génétique *daf-2* hypomorphe afin d'optimiser la formation des larves dauer.

II. 2. Régulation de la mise en place des réserves lipidiques.

Lors des expériences de formation des larves dauers, nous avons remarqué un défaut de pigmentation des animaux poursuivant leur développement jusqu'au stade adulte. Ces animaux apparaissaient tachetés et donc globalement plus clairs que les animaux soumis au RNAi contrôle. Nous avons montré que FTT-2 stimule le stockage lipidique des individus sauvages, des mutants *daf-2* hypomorphes ainsi que celui des mutants de délétion de *daf-16* (ajoutés à cette expérience) et que FTT-1 n'intervient que dans la régulation positive de celui des mutants *daf-2* perte de fonction de classe 2 (*daf-2(e1370)*) (voir article figure 8). L'accumulation de réserves lipidiques constitue une caractéristique des mutants *daf-2* hypomorphes et des larves dauers [239] qui est entièrement dépendante de l'expression de DAF-16 [250]. De façon inattendue, tandis que FTT-2 inhibe partiellement la formation des larves dauers lors du développement, nos résultats indiquent que FTT-2 régule positivement la mise en place des réserves lipidiques pendant la même période. De plus, nous montrons que cette régulation est au moins en partie indépendante de DAF-16.

Un candidat intéressant pour cette régulation est la voie LET-363/DAF-15. En effet, Jia et al. ont montré que la voie LET-363/DAF-15 participe à la régulation du métabolisme

lipidique indépendamment de l'intervention de DAF-16 [126]. En effet, cette étude a montré que des mutants perte de fonction pour *let-363* ou *daf-15* présentent une accumulation anormale des stocks lipidiques, similaire à celle des mutants *daf-2* hypomorphes mais que ce phénotype n'est pas supprimé par une mutation nulle de *daf-16*. Ces résultats suggèrent que la voie LET-363/DAF-15 se situerait en aval de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 et serait régulée par celle-ci ; alternativement, LET-363/DAF-15 pourrait constituer une nouvelle voie de signalisation qui fonctionne en parallèle de DAF-2/Ins/IGF-1 au moins pour réguler le métabolisme lipidique.

Une autre piste à explorer, réside dans l'implication des protéines FTT dans la régulation de la voie neuronale utilisant le gène *tubby*. La fonction de *tubby* chez les mammifères ou *tub-1* chez *C. elegans* est conservée : il s'agit d'un régulateur du stockage des lipides. Une mutation réduction de fonction de *tubby* chez la souris entraîne une obésité de l'adulte, une résistance à l'insuline et des déficits neurosensoriels progressifs [399] ; chez *C. elegans*, une mutation hypomorphe de *tub-1* conduit à une augmentation des réserves lipidiques [83, 400]. Exprimée sélectivement dans les neurones, la protéine TUB-1 interagit avec RBG-3, une « Rab GTPase-activating protein » (RabGAP), pour réguler une voie d'endocytose impliquant la GTPase ubiquitaire RAB-7, qui lui permet, au final, de contrôler l'accumulation des réserves lipidiques [401]. Le stockage des lipides a lieu seulement dans les cellules intestinales du ver ; ceci suggère l'existence d'un signal hormonal relayant l'information depuis les neurones exprimant TUB-1 et RBG-3 jusqu'à l'intestin. La nature de cette composante neuroendocrine est jusqu'ici inconnue. Cependant, il a été montré que la voie DAF-2/Ins/IGF-1 n'intervient pas puisqu'une mutation perte de fonction de DAF-16 ne supprime pas l'accumulation des lipides observée chez les mutants *tub-1* [400]. Il serait intéressant de déterminer si les protéines FTT interviennent dans la voie d'endocytose régulée par *tub-1* pour influencer le stockage des lipides. Par exemple, un marquage des lipides grâce au colorant Nile Red chez des mutants *tub-1(nr2004)* perte de fonction dans un contexte génétique sensible au RNAi au niveau des neurones (*rrf-3(pk1426)*), et soumis au RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* nous fournirait des renseignements capitaux pour répondre à cette question.

II. 3. Régulation de la longévité des animaux adultes par une action lors du développement.

Nous avons montré que FTT-2, et à un moindre degré FTT-1, est requis lors du développement afin de promouvoir la longévité des adultes (voir article figure 7).

L'administration des traitements RNAi contre *ftt-1* ou *ftt-2* à partir de l'éclosion jusqu'au stade adulte engendre des phénotypes de raccourcissement de longévité plus marqués que lors des traitements initiés sur des individus adultes. Cette diminution est même dramatique pour les animaux soumis au RNAi *ftt-2* qui présentent une courbe de longévité inhabituelle. Nous nous sommes alors interrogés sur la potentielle interférence d'un effet non-spécifique, capable de rendre les animaux malades. Cependant, le fait que la longévité des animaux ne soit pas affectée dans la même proportion selon le fond génétique testé, indique que les effets que nous observons sont bel et bien spécifiques de la diminution d'expression de l'un ou l'autre des gènes *ftt* pendant le développement.

Le « knock down » de *ftt-1* et *ftt-2* affecte aussi bien les animaux sauvages, que les deux classes de mutants *daf-2* hypomorphes ainsi que les mutants de délétion de *daf-16*. Ces résultats montrent que FTT-1 et FTT-2 sont impliqués dans différents mécanismes de régulation de la longévité, dépendants et indépendants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 lors du développement.

Enfin, contrairement à la voie DAF-2/Ins/IGF-1 qui n'est requise que pendant la période post-reproductive pour agir sur la durée de vie de l'animal, FTT-1 et FTT-2 sont nécessaires à la régulation de la longévité lors de deux périodes distinctes, pendant les stades larvaires et à partir du stade adulte jusqu'en fin de vie et participent à des mécanismes partiellement différents pendant ces deux intervalles de temps. Il se pourrait que les protéines FTT soient par exemple impliquées dans la régulation d'un des deux facteurs de croissance fibroblastique FGF (« fibroblast growth factor ») de *C. elegans*, LET-756, qui est essentiel au développement du ver [402]. Cette piste est d'autant plus intéressante qu'il a été montré que FTT-1 et FTT-2 interagissent avec LET-756 et régulent sa localisation nucléo-cytoplasmique dans un système hétérologue (cellules de mammifères) [403]. Tout d'abord, il faudrait vérifier l'existence de cette régulation *in vivo*, chez *C. elegans*, en visualisant l'effet d'un RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* sur la localisation de LET-756 couplé à une GFP. Par la suite, des traitements RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* pourraient être administrés à des mutants *let-756* perte et gain de fonction spécifiquement pendant le développement, afin d'évaluer l'impact des protéines FTT sur cette voie durant cette période.

Notre étude a également mis en évidence que les protéines FTT influencent la cinétique du développement des animaux jusqu'au stade adulte et ce de façon dépendante et indépendante de DAF-16. La voie LET-363/DAF-15 peut, ici aussi, constituer un candidat potentiel puisqu'il est décrit qu'elle interagit avec la voie DAF-2/Ins/IGF-1 dans la régulation du développement larvaire. Ainsi, des mutants perte de fonction de *let-363* ou *daf-15* étant incapables d'atteindre le stade adulte et restant bloqués au stade L3. Par ailleurs, un

phénotype de développement « ralenti » n'impliquant pas DAF-16 a déjà été observé chez les mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale *clk-1* [404]. L'implication des protéines FTT dans chacune de ces deux voies pourrait être testée en traitant des mutants *let-363*, *daf-15* et *clk-1* perte de fonction avec un RNAi *ftt-1* ou *ftt-2* du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte.

La contribution prépondérante de FTT-2 dans l'ensemble des phénotypes observés, par rapport à celle de FTT-1, peut s'expliquer par une expression différentielle des deux gènes au niveau des différents tissus du nématode. D'après le premier article consacré aux profils d'expression tissulaire et temporelle des deux gènes *ftt* [380], déterminés par hybridation *in situ* des différents transcripts, *ftt-1* s'exprime majoritairement dans les cellules de la lignée germinale, tandis que l'expression de *ftt-2* est strictement somatique. Bien que la contribution de la gonade aux signaux de survie ne soit pas négligeable, celle de l'intestin est plus importante; cela expliquerait que FTT-1 influence moins la longévité que FTT-2, qui est exprimé dans des tissus plus cruciaux pour la régulation de celle-ci. Cependant, l'observation d'animaux transgéniques exprimant une construction contenant FTT-1 ou FTT-2 étiquetée avec une GFP a révélé des profils d'expression en désaccord avec cette hypothèse ; en effet, d'après Wang *et al.* [384] FTT-1 se localise dans des tissus somatiques, parmi lesquels l'intestin, où elle s'exprime avec une intensité supérieure à celle de la protéine FTT-2 ::GFP. Mais ces données sont à utiliser avec précaution car elles reflètent la surexpression de protéines exogènes et d'ailleurs l'expression germinale de FTT-1 initialement rapportée par « Northern Blot » n'a pas été rapportée chez les animaux transgéniques. Pour trancher sur cette question, il faudrait déterminer la contribution de chacune des protéines FTT dans les différents tissus importants pour la régulation de la longévité de l'animal ; à cette fin, une approche de RNAi tissu-spécifique pourrait être utilisée.

La régulation de la longévité de *C. elegans* constitue un mécanisme complexe qui requiert le concours de plusieurs voies de signalisation. Ce travail de thèse a tout d'abord permis de mettre en évidence l'implication des protéines FTT dans la modulation de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, voie majeure contrôlant la durée de vie du nématode, la résistance au stress, la formation des larves dauers ainsi que le métabolisme. Notre étude a ainsi contribué à déterminer le rôle respectif de chacune des deux protéines FTT dans la régulation des différentes fonctions biologiques contrôlées par cette voie et à mettre en évidence le rôle prépondérant de FTT-2.

Nos expériences ont ensuite permis de révéler la contribution exclusive de FTT-2 à la modulation d'une voie parallèle à la voie canonique DAF-2/Ins/IGF-1 qui, tout en ne convergeant pas sur DAF-16, est néanmoins capable de réguler la résistance au stress, le métabolisme lipidique et la longévité. En outre, le fait que la régulation de cette voie parallèle soit uniquement dévolue à FTT-2 indique qu'à l'instar des protéines 14-3-3 chez les mammifères, chacune des protéines FTT possède des fonctions spécifiques.

Enfin, ce travail a permis de préciser que les mécanismes impliqués dans la résistance au stress étaient sous le contrôle des deux voies (canonique et parallèle) et ce, aussi bien à l'état physiologique basal, qu'en réponse à un stress induit.

En résumé, les résultats de notre étude confirment la complexité des fonctions des protéines FTT en démontrant leur participation à plusieurs processus importants pour la survie de *C. elegans*. Ainsi que nous l'avons souligné, de nombreuses pistes restent à explorer afin d'expliquer ces effets ; cet exercice est rendu difficile en raison des nombreux partenaires possibles et des multiples propriétés des protéines de la famille 14-3-3, c'est pourquoi une approche plus systématique de type criblage protéomique (expériences de double hybride) suivie d'une validation des interactions par approche biochimique permettrait d'identifier de nouveaux partenaires des protéines FTT et d'orienter ainsi les expériences futures.

Une meilleure compréhension de l'intervention de ces protéines dans les différentes voies de signalisation mises en jeu pour réguler la longévité du nématode devraient faciliter celle des mécanismes du vieillissement humain et de certaines pathologies associées.

ANNEXES

Publication 2 (en préparation)

14-3-3 can promote life span and metabolism in the *Caenorhabditis* genus.

Caroline Araiz* and Simon Galas*+

*CRBM-CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France;

+ Université Montpellier1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault - B.P. 14491,
34093 Montpellier cedex 5, France

Caenorhabditis elegans constitue un modèle animal de choix dans les études sur le vieillissement et il s'agit du principal modèle que nous utilisons au laboratoire.

Caenorhabditis briggsae est une espèce voisine de *C. elegans*, tous deux étant issus d'un ancêtre commun il y a environ cent millions d'années. *C. briggsae* est fréquemment utilisé dans des études de génomique comparative afin de déterminer les fonctions spécifiques des gènes orthologues de ceux présents chez *C. elegans* [405]. En effet, des caractères spécifiques de chaque espèce, tels que la détermination de l'hermaphroditisme [406, 407], la longévité des mâles [408] (les mâles *C. elegans* ont une durée de vie supérieure à celles des hermaphrodites de la même espèce, alors que ce n'est pas le cas pour les mâles et les hermaphrodites *C. briggsae*) ou encore la sensibilité à la température [409] ont été rapportés. Malgré ces divergences, les deux nématodes présentent néanmoins une morphologie et un comportement semblables, un génome de taille similaire organisé en six chromosomes et un nombre de gènes codant pour des protéines et de pseudogènes comparables [410] (www.wormbase.org) ; de plus, le séquençage du génome de *C. briggsae* a révélé que plus de 60% de ses gènes possèdent des orthologues chez *C. elegans* [411]. De ce fait, la majorité des outils génétiques disponibles pour *C. elegans* peuvent être utilisés chez *C. briggsae* sans modifications majeures.

Alors que nous finalisons les expériences en vue de la publication du travail sur le rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité chez *C. elegans*, nous avons décidé de tester la conservation de ce mécanisme chez *C. briggsae*, aucune donnée n'ayant été publiée auparavant. Tout comme *C. elegans*, *C. briggsae* possède deux protéines 14-3-3, également appelées FTT pour *fourteen-three-three*, Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2 respectivement codées par les gènes *Cbr-fft-1* et *Cbr-fft-2*. Ces gènes présentent une identité de séquence de 95% et 99% avec leurs orthologues chez *C. elegans*, *Ce-fft-1* et *Ce-fft-2*, ce qui nous a permis d'utiliser les mêmes outils RNAi que ceux employés dans notre étude chez *C. elegans* (voir publication 1). La voie DAF-2/Ins/IGF-1 est conservée chez *C. briggsae* ; cependant, les mutants des différents composants de cette voie, notamment *daf-2* et *daf-16*, équivalents à ceux que nous avons utilisés chez *C. elegans*, n'étaient et ne sont toujours pas disponibles au « *Caenorhabditis* Genetic Center ». Nous avons donc commencé à caractériser l'implication des protéines Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2 dans la régulation de la longévité, du développement, de l'entrée en dauer, des réserves lipidiques et de la résistance au stress oxydant sur la souche *C. briggsae* sauvage AF16. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication en préparation qui est insérée ci-après.

**14-3-3 can promote life span and metabolism
in the *Caenorhabditis* genus.**

Caroline Araiz* and Simon Galas*+

*CRBM-CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France;

+ Université Montpellier1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault - B.P. 14491,
34093 Montpellier cedex 5, France

Corresponding author:

Simon Galas, CRBM-CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France.

Phone: +33 (0)4 67 61 34 32, FAX: +33 (0)4 67 52 15 59.

Abstract.

The 14-3-3 gene products control life span, development, stress resistance and metabolism in *Caenorhabditis elegans* by both DAF-16 -dependent and -independent mechanisms. Here we show that 14-3-3-dependent molecular regulatory mechanisms also exist in *Caenorhabditis briggsae*, arguing for conservation of molecular mechanisms between these species that diverged from each other approximately 80-110 million years ago. We report a 14-3-3-dependent mechanism shared by both *Caenorhabditidae* species and involved in development, aging as well as fat storage. We conclude that 14-3-3 may regulate aging through similar targets, either in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*.

Background.

The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) has become one of the most widely used models for aging studies and single gene mutations have been a powerful technique in deciphering aging modulatory genes [1]. The evolutionary conserved Insulin/IGF-1/DAF-2 signalling pathway is believed to regulate life span through inhibition of DAF-16, a FOXO transcription factor family member [1]. More recently, 14-3-3 gene products have been reported to promote *C. elegans* life span by both DAF-16 –dependent [2] and –independent mechanisms [3]. Cell regulatory pathways, including signal transduction, apoptosis, stress response and transformation can be targeted by one or several 14-3-3 proteins in organisms ranging from yeast to human [4]. The 14-3-3's family members are discrete binding proteins with

no intrinsic enzymatic activity. Moreover, the 14-3-3 proteins can act as enzymatic regulators, localization anchors or scaffolding molecules that can, in turn, stimulate various protein-protein interactions [1, 4]. To date, 14-3-3's family members have been found to be ubiquitous in all eukaryotes [4]. Interestingly, most organism genomes encode at least two or several distinct 14-3-3 isoforms (i.e. seven in mammals and fifteen in *Arabidopsis*) [4, 5]. Both *C. elegans* [6] and congener *Caenorhabditis briggsae* (*C. briggsae*) genomes encode two 14-3-3 genes [7] that have been described as *ftt-1* and *ftt-2* genes in *C. elegans* (*ftt* for fourteen-three-three) [8]. The *C. briggsae* species is estimated to have diverged from *C. elegans* approximately 80-110 million years ago [7]. *C. briggsae* worms are almost indistinguishable by eye from *C. elegans* worms but divergent traits have already been reported such as the independent origins of hermaphroditism [9] or longer-lived hermaphrodites when compared to males. Nevertheless, both *C. briggsae* and *C. elegans* share an androdecious character [10]. However similar traits between *C. briggsae* and *C. elegans* have been reported such as a growth-repressing signal emerging from the germ-line [11], known as a DAF-16-independent mechanism in *C. elegans*, or an endoderm gene-dependent specification [12]. Here we show that 14-3-3 can promote *C. briggsae* life expectancy, lipid metabolism and development, as reported in *C. elegans* [3]. This report gives an indication for future findings about life span regulatory mechanisms by defining the Insulin/IGF-1/DAF-2/DAF-16 pathway as a possible main target for 14-3-3-dependent regulation of aging in *C. briggsae* as well as in *C. elegans*.

Results and Discussion.

14-3-3 can promote C. briggsae life span.

The *C. briggsae* CBP01528 and CBP04148 predicted 14-3-3 gene products share respectively 95% and 99% identity with the *C. elegans ftt-1* and *ftt-2* gene products (www.wormbase.org). Moreover, while lethal phenotypes for *C. elegans ftt-1* or *ftt-2* loss-of-function mutants have been reported [2], RNA-mediated gene interference (RNAi) has been successfully used for specific gene targeting [2, 3, 13-15]. Therefore, we checked the life span of adult worms, upon either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi (Fig. 1A and Table 1). A strong life span shortening was observed in comparison with control RNAi and appeared more severe upon *ftt-2* than *ftt-1* RNAi (Fig. 1A). Statistical analysis (Table 1) showed a highly significant life span difference between both *ftt-2* and control RNAi only (Log-Rank $p < 0.0001$) while *ftt-1* RNAi failed to produce such a strong effect and promoted a non-significant life-span modulation (Log-Rank $p = 0.004$). Moreover, we also observed that both maximum and mean life span were mainly impaired only with *ftt-2* RNAi (Table 1). Altogether, our observations are well correlated with those reported for *C. elegans* [3] where both *ftt* genes also promote life span with different orders of magnitude.

Aging shape and 14-3-3-dependent phenotype in C. briggsae.

During our control life span experiments, we were surprised to note a clear worm shape heterogeneity in the *C. briggsae* population. Thus, while a worm population fraction revealed a

classical elderly shape (Fig. 1C) as previously described [16] for *C. elegans* (Fig. 1B), other worms died adopting a “small chain-like” shape (Fig. 1D) or a “bagging” phenotype (Fig. 1E) as a result of internal hatching in hermaphrodites, also known as a “matricide effect” [10]. It is however interesting to note that these different elderly phenotypes were observed at the same time in the synchronized *C. briggsae* population (Fig. 1.C-E). The “bagging” phenotype has already been described for *C. briggsae* and several nematode species as well [10]. Interestingly, while we previously reported a 15% “bagging” phenotype in *C. elegans* wild-type adults only after *ftt-2* RNAi treatment during development [3], here we observed this phenotype in *C. briggsae* adults even when they were bred on *E. coli* HT115(DE3) (Fig. 1E) or *E. coli* OP50 strains (data not shown). This “bagging” fraction reached 66% when *C. briggsae* worms were fed with *ftt-2* RNAi bacteria during development. Altogether, our observations lead us to conclude that a fraction of the *C. briggsae* “bagging” phenotype may be considered as an effect inherent to basic worms culture conditions applied to this species, whereas an increased occurrence is specifically conferred by *ftt-2* RNAi during development.

As we previously described in *C. elegans* [3], we observed a fully penetrant embryonic lethal phenotype in the progeny of *C. briggsae* hermaphrodites submitted to *ftt-1* RNAi, but not to *ftt-2* RNAi, just before the egg laying period (data not shown). Altogether with our previous observations retrieved in *C. elegans* upon identical RNAi treatments [3], the data presented here argue for strict non-overlapping phenotypes induced by our *ftt* specific RNAi tools.

14-3-3 can influence C. briggsae life expectancy by acting only during development.

To discriminate between post-developmental and/or developmental life span modulation effect of a given *ftt* gene product, we next investigated *C. briggsae* life span when either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi was applied only during a life history window starting from hatching to L4/young adult stage. As shown in Fig. 2 and Table 2, we observed a more significant life span shortening upon *ftt-2* RNAi than with *ftt-1* RNAi treatment in comparison with control. Moreover, a comparison of the survival curves data between RNAi treatments during developmental or post-developmental periods (Compare Table 1 and 2) clearly indicates that *C. briggsae* life span is - as reported for *C. elegans* [3] - more impaired by *ftt* RNAi induction during development than during post-developmental life period. This observation is also well correlated with *ftt*-dependent specific phenotypes reported in this study and reinforces the view of a more pleiotropic effect of 14-3-3 gene products during the pre-reproductive period than during the reproductive and post-reproductive periods. Moreover, the L4/young adult stage was reached after a 12 and 24 h. delay for worms fed with either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi, respectively. Thus, both *ftt* gene products are also involved in the regulation of the rate of development in wild type animals as demonstrated for wild type *C. elegans* [3]. Interestingly, *ftt-1* gene product seems to be a slighter modulator of this aspect in *C. briggsae* than in its congener, suggesting a difference in the evolution of *ftt-1* functions in both species.

14-3-3 fail to modulate oxidative stress resistance in wild type C. briggsae.

In *C. elegans*, both 14-3-3 genes products have been reported to promote acute and normal stress resistance by both FOXO/DAF-16 -dependent and -independent mechanisms [2, 3]. We then tested *C. briggsae* for Menadione stress resistance upon *ftt* RNAi. The Menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone or vitamin K3) is a lipid-soluble substance that has been extensively used as an oxidant stressor in yeast [17] and in *Arabidopsis thaliana* as well [18]. Menadione can generate reactive superoxide ions, which can be further oxidized to yield hydrogen peroxide and has been reported to deplete total glutathione concentration in yeast cells by generation of menadione S-glutathione conjugates [19]. We examined the effect of Menadione by determining survival of adult worms subjected to 10mM Menadione after one week of either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi treatment (see Material and Methods). As shown in Figure 3, neither *ftt-2* nor *ftt-1* RNAi produced a significant survival difference in comparison with control. We previously reported that both *C. elegans ftt* genes are involved in promoting Menadione oxidative stress resistance only in a DAF-16 deficient genetic background thus participating to a DAF-16-independent mechanism [3]; nevertheless it is important to notice that we couldn't detect any effect of neither *ftt-1* nor *ftt-2* RNAi on survival of *C. elegans* wild type worms exposed to menadione. This observation is of great interest because it shows that assessing oxidative stress resistance only in a wild type genetic background may not be conclusive for the implication of *ftt* gene products in the regulation of this process. Therefore, we can't conclude for the conserved role of 14-3-3 in *C. briggsae* regarding the promoting effect on oxidative stress resistance and further investigations on various mutants are still needed to answer this question.

***C. briggsae* fat storage can be influenced by 14-3-3.**

The IGF-1/DAF-2/DAF-16 pathway controls fast metabolizing or fat storing decision occurring during worm larval growth in *C. elegans* [20] and we previously showed that fat storage can be impaired by 14-3-3 RNAi in *C. elegans* by both DAF-16 –dependent and –independent mechanisms [3]. We next assessed for a modulation of lipid accumulation by *ftt-1* or *ftt-2* RNAi in *C. briggsae* by using Nile Red staining as described in Materials and Methods Section. As shown in Figure 4.B-D, the apparent fat content was reduced upon both *ftt* RNAi conditions in comparison with controls. Therefore, quantification of Nile Red lipid staining (Fig.4.A) revealed that the fat amount was more impaired by *ftt-2* than by *ftt-1* RNAi although both *ftt* RNAi effects yielded a statistical significant difference. Altogether, these results indicate that *ftt-2* cooperates with a mechanism involved in a positive control of lipid accumulation as we previously reported in *C. elegans* [3]. However, our data also imply that while only *ftt-2* can significantly modulate fat storage in *C. elegans* [3], both *ftt* genes can do the same in *C. briggsae*. This result suggests that during evolution *C. briggsae* *ftt-1* gene has gained this function or, inversely, *C. elegans* *ftt-1* gene has lost it. Further investigations are needed to determine whether in *C. briggsae* the modulation of lipid reserves by *ftt* gene products are mediated by both the DAF-2/Ins/IGF-1 pathway and a DAF-16 –independent mechanism, as we reported in *C. elegans*.

***Enhancement of C. briggsae* dauer formation by 14-3-3.**

Upon harsh conditions, *C. elegans* can form dauer larvae, a quiescent stage with developmental arrest, non-feeding activity, stress resistance and long-lived characteristics [21]. In

this work we show that both *C. briggsae* 14-3-3 genes orthologs can positively modulate lipid content accumulation (a well reported dauer larvae trait). Because only *ftt-2* RNAi has been reported to promote dauer formation in *C. elegans* [3, 15] we then assessed for a possible *ftt*-dependent dauer promoting effect in *C. briggsae* as well. The wild type *C. elegans* larvae do not form dauer when cultured at 22.5°C but they do when *ftt-2* RNAi is applied to a *daf-2* reduction of function mutant at 22.5°C [3]. Thus, the effect of 14-3-3 on *C. elegans* is not potent enough to induce a Daf-c (Dauer constitutive) phenotype when targeted by RNAi in a wild type genetic background. As shown in table 3, the *C. briggsae* larvae failed to form dauer larvae when cultured at 22.5°C and fed by either *ftt-1* or *ftt-2* RNAi, even until 72 hours after hatching. Thus, as described for N2 in *C. elegans* [3], the wild type genetic background of *C. briggsae* AF16 is not sensitive enough to highlight the involvement of *ftt* gene products in dauer promotion. The use of *C. briggsae daf-2* mutants should help determining whether they are conserved modulators of the main pathway controlling dauer formation.

Conclusion.

Because *C. elegans* is a well-accepted model for aging studies, new identified regulatory mechanisms are growing faster in this organism. New molecular regulatory insights data from a congener such as *C. briggsae* can be regarded such as a *C. elegans* model strengthening by the new comparative molecular analysis tools already available [7, 22]. In *C. elegans*, control of aging and stress-response share regulatory mechanisms that converge to DAF-16 modulation. The 14-3-3's family members have been found ubiquitous in eucaryotes [4] which genomes

encode at least two isoforms. We assessed for 14-3-3-dependent life span control, development, metabolism and stress-resistance in *C. briggsae*. Because RNAi effects has been successfully described in *C. briggsae* [23, 24], we used RNAi to target both 14-3-3 gene products and demonstrated the specificity of our tools because of non-overlapping phenotypes reported such as embryonic lethal phenotype, only induced by *ftt-1*-RNAi or the specific increased “bagging” phenotype only with *ftt-2* RNAi. Similar specific phenotypes have also been described in *C. elegans* with corresponding molecular tools [3]. Moreover, previous cross-species RNAi efficiency tools between both *Caenorhabditidae* species have also been described elsewhere [12]. In summary we have revealed, for the first time, molecular mechanisms conserved between *C. elegans* and *C. briggsae* that promote development, aging as well as fat storage that may use the same molecular targets such as the Insulin/IGF-1/DAF-2/DAF-16 pathway. However, we also show in the present work that *ftt-1* gene product plays a more important role in lipids storage than it does in wild type *C. elegans*. We can suppose that despite a partial conservation, *ftt-1* function may have evolved differently between the two *Caenorhabditidae* species. Further studies focusing on divergences in the properties of 14-3-3 modulation of the aging regulatory pathways between *C. elegans* and *C. briggsae* mutants may provide new insights about the plasticity of the fundamental mechanisms controlling life span in an evolutionary window of 80-110 million years [7].

Methods.

Strains and worms cultures.

Worms were cultured and maintained as described previously [25]. Wild type *C. elegans* Bristol (N2), *C. briggsae* (AF16) strains and *E. coli* strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resources). Unless specified, worms were cultured at 20°C.

RNAi feeding assays.

14-3-3 RNAi constructs have already been described [3]. Adult stage RNAi: L4 larvae fed with RNAi producing bacteria were allowed to grow on NGM plates until they died. To avoid offspring during experiments we used plates with FUDR. Dead worms were scored every day until all worms die. Vitality was assessed by the animal response to one or several gentle nose touch. Worms that died by scrolling out of agar plates were scored as censored data. XLSTAT-life statistical software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan Meier method and differences between survival curves were calculated by using the Log Rank test with 95% confidence. Developmental stage RNAi and dauer assay : five to ten L4/young adult hermaphrodites were permitted to egg-lay during two hours on plates seeded with transformed HT115 *E. coli* at 22.5°C. The progeny was then allowed to grow on these same conditions. Delay to reach L4 stage was checked comparing to control RNAi conditions. All the worms growing to L4/young adult stage were transferred on NGM plates with only FUDR and OP50 *E. coli* strain then scored for life span. Dauer larvae formation was scored

until around 72 hours after hatching.

Nile red fat staining and oxidative stress resistance assay.

Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxa-]phenoxazine-5-one/N-1142) purchased from Molecular Probes was used as described [3].

After one week of RNAi treatment the adult worms were then transferred in a 24-wells plate (about 50 worms per well), with 10mM of Menadione (Sigma-Aldrich) and scored for survival.

Microscopy observation and pixels quantification.

Microscopy observations were done on a Zeiss AxioImager.Z1 with a Photometrics CoolSnap HQ2 camera at 400X magnification with Zeiss Plan Neofluar-1.3 or Zeiss Apochromat-1.4 objectives respectively. Nile red staining was assessed by using a Zeiss FS00, BP530-585, FT600, LP615 red filter. Pixels quantification was done by using Metamorph v7.1 software (Molecular Devices, USA) while data analysis by a Student's t-test were done by using XLSTAT software (Addinsoft, New York, NY, USA). Worm pictures were taken on a Leica MZ 9.5 stereomicroscope.

Author's contributions

CA carried out molecular genetic studies, data collection and analysis. Performed statistical analysis and participated in draft the manuscript. SG conceived of the study, participated in its design and coordination. Writing the manuscript.

Acknowledgments.

We thank Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis elegans* Genetics Center for providing strains. We are specially grateful to MRI (www.mri.cnrs.fr) and its technical assistance. We thank Julia Pfitzner, Victoria Malchin, Nga Nguyen and Professor Ulrich Mok, from Lise-Meitner-Oberstufenzentrum, Berlin, Germany, for technical assistance. We thank Dr. Andrew Burgess for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, C. Araiz is a PhD fellow of AFM (www.afm-france.org) and ARC (www.arc.asso.fr).

References.

1. Kenyon C: The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 2005, 120: 449-460.
2. Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR and Guarente L: *C. elegans* SIR-2.2 interacts with 14-3-3 Proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 2006, 125: 1165-1177.
3. Araiz C, Château MT and Galas S: 14-3-3 regulates life span by both DAF-16-dependent and -independent mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 2008, 43 : 505-519.
4. Van Hemert MJ, Steensma HY, Van Heusden GP: 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001, 23: 936-946.
5. Wang W, Shakes DC: Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J. Mol. Evol.* 1996, 43: 384-398.
6. The *C. elegans* Sequencing Consortium: Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 1998, 282: 2012-2018.
7. Stein LD, Bao Z, Blasiar D *et al.*, (36 co-authors): The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *Pub. Lib. Sci. Biol.* 2003, 1: 166-192.

8. Wang W Shakes DC: Isolation and sequence analysis of a *Caenorhabditis elegans* cDNA which encodes a 14-3-3 homologue. *Gene* 1994, 147: 215-218.
9. Kiontke K, Gavin NP, Raynes Y, Roehrig C, Piano F and Fitch DH: *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004, 101: 9003-9008.
10. McCulloch D and Gems D: Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell* 2003, 2: 165-73.
11. Patel MN, Knight CG, Karageorgi C, and Leroi AM: Evolution of germ-line signals that regulate growth and aging in nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002, 99: 769-774.
12. Maduro MF, Hill RJ, Heid PJ, Newman-Smith ED, Zhu J, Priess JR and Rothman JH: Genetic redundancy in endoderm specification within the genus *Caenorhabditis*. *Dev Biol.* 2005, 284: 509-522.
13. Morton DG, Shakes DC, Nugent S, Dichoso D, Wang W, Golden A, Kemphues KJ: The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev Biol.* 2002, 241: 47-58.
14. Wang Y, Wook Oh S, Deplancke B, Luo J, Walhout AJM and Tissenbaum HA: *C. elegans* 14-3-3 proteins regulates life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev.* 2006, 127: 741-747.
15. Li J, Tewari M, Vidal M and Lee SS: The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 2007, 301: 82-91.
16. Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, Paupard MC, Hall DH and Driscoll M: Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 2002, 419: 808-814.

17. Shackelford RE, Kaufmann WK and Paules RS: Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28: 1387-404.
18. Baxter CJ, Redestig H, Schauer N, Repsilber D, Patil KR, Nielsen J, Selbig J, Liu J, Fernie AR, Sweetlove LJ: .The Metabolic Response of Heterotrophic Arabidopsis Cells to Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 2007, 143: 312-325.
19. Zadzinski R, Fortuniak A, Bilinski T, Grey M and Bartosz G: Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem Mol Biol Int.* 1998, 44: 747-759.
20. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA and Ruvkun G: The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997, 389: 994-999.
21. Klass M and Hirsh D: Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1976, 260: 523-525.
22. Inoue T, Ailion M, Poon S, Kim HK, Thomas JH, Sternberg PW : Genetic Analysis of Dauer Formation in *Caenorhabditis briggsae*. *Genetics* 2007, 177 : 809-818.
23. Nayak S, Goree J, Schedl T :fog-2 and the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis*. *PLoS Biology* 2005, 3 : e6.
24. Rudel D, Kimble J : Conservation of *glp-1* Regulation and Function in Nematodes. *Genetics* 2001, 157 : 639-654.
25. Brenner S: The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974, 77: 71–94.

Figures Legends.

Figure 1. 14-3-3 RNAi shorten *C. briggsae* life span.

Adult *C. briggsae* life-span analysis trials were done on RNAi plates as described in Material and Methods Section. (A) Survival curves of worms fed with control RNAi (empty squares), *ftt-2* RNAi (filled circles) or *par-5/ftt-1* RNAi (filled triangles). XLSTAT-life software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan Meier method. Representative *C. elegans* (B) or *C. briggsae* (C-E) pictures taken at four days of adulthood when fed by control RNAi and showing the growing old shape of *C. elegans* (B) and the “small chain-like” shape of *C. briggsae* (C). Characteristic “bagging” phenotype of *C. briggsae* (as a result of internal hatching) of four days old worms (D-E). Scale Bars represent 100 μ M.

Figure 2. *C. briggsae* life span shortening by pre-reproductive 14-3-3 RNAi.

Survival curves of worms fed with control RNAi (empty squares), *ftt-2* RNAi (filled circles) or *ftt-1* RNAi (filled triangles) only during pre-reproductive period. XLSTAT-life software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan Meier method. Worms were allowed to hatch on bacteria expressing corresponding RNAi then transferred at L4/young adult stage to new plates and fed by RNAi-free bacteria (*E. coli* OP50 strain) then scored for life span. All experiments were done at 22.5°C. The XLSTAT-life software (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to plot survival data by the Kaplan Meier method.

Figure 3. Oxidative stress resistance prevention by 14-3-3 RNAi.

Young adults were fed by bacteria carrying control RNAi or either *ftt-2* or *ftt-1* RNAi vector then subjected for viability after oxidative treatment with Menadione as described in Materials and

Methods section. Results presented are mean values +/- standard error (S.E.M) of at least seven independent trials. Statistical analysis was done by a Student's *t*-test and yielded significant difference at ** $p < 0.005$ and * $p < 0.05$. Total number of scored worms for each RNAi condition are in parentheses: *C. briggsae*-Control RNAi (N=420); *C. briggsae-fft-2* RNAi (N= 662); *C. briggsae-fft-1* RNAi (N=476).

Figure 4. *C. briggsae* lipids accumulation modulation by 14-3-3.

(A) Worms were allowed to hatch at 22.5°C on bacteria expressing either control, *fft-2* RNAi or *fft-1* RNAi together with Nile Red lipid staining until young adult stage. Pixels quantification analysis of staining was done as described in Materials and Methods on several trials totalizing up to 114 animals. Mean values are expressed after normalization with respective control RNAi which represents 100%. Bars represent the standard error (S.E.M.) and Statistical Student's *t*-test comparison between control and *fft* RNAi, where significance is raised when ** p value < 0.005 , gave the following results: $p = 0.000005$ for *fft-2* RNAi and $p = 0.001$ for *fft-1* RNAi. The calculated p value between *fft-2* and *fft-1* RNAi was $p = 0.02$. Representative pictures of the corresponding Lipid Staining for either control (B), *fft-2* (C) or *fft-1* RNAi (D). Adult worms pictures were taken as described in Materials and Methods Section. Scale bars represent 10 μ M.

Tables Legends.

Table 1. *C. briggsae* life span modulation by 14-3-3 RNAi.

The tabulated data of Fig.1A show the average results of four independent RNAi trials. LogRank test with 95% confidence degree (XLSTAT-life software-Addinsoft, New York, NY, USA) was

used for calculation of difference between survival curves. (£) Represent the 50th percentile (when the animals survival fraction reaches 0.50); (□) Experiment identification code; (\$) Probability of control experiment to be identical to 14-3-3 RNAi trial; (*) Total death scored (number of censored data).

Table 2. *C. briggsae* life span shortening by developmental 14-3-3 RNAi.

The tabulated data of Fig. 2 show the average results of independent RNAi trials at 22.5°C. LogRank test with 95% confidence degree (XLSTAT-life software-Addinsoft, New York, NY, USA) was used for calculation of difference between survival curves. (£) Represent the 50th percentile (when survival fraction animal reaches 0.50); (□) Experiment identification code; (\$) Probability of control experiment to be identical to 14-3-3 RNAi trial; (*) Total death scored (number of censored data).

Table 3. 14-3-3 RNAi knock downs do not promote constitutive dauer induction phenotype in *C. briggsae*.

C. briggsae worms were allowed to hatch on bacteria carrying either *fit-1*, *fit-2* or control RNAi construct at 22.5°C in order to create a dauer constitutive phenotype induction sub-threshold. Dauer larvae formation was scored as described in Material and Methods. Total numbers of worms scored for each RNAi condition are shown (last lane).

Figure 1 A

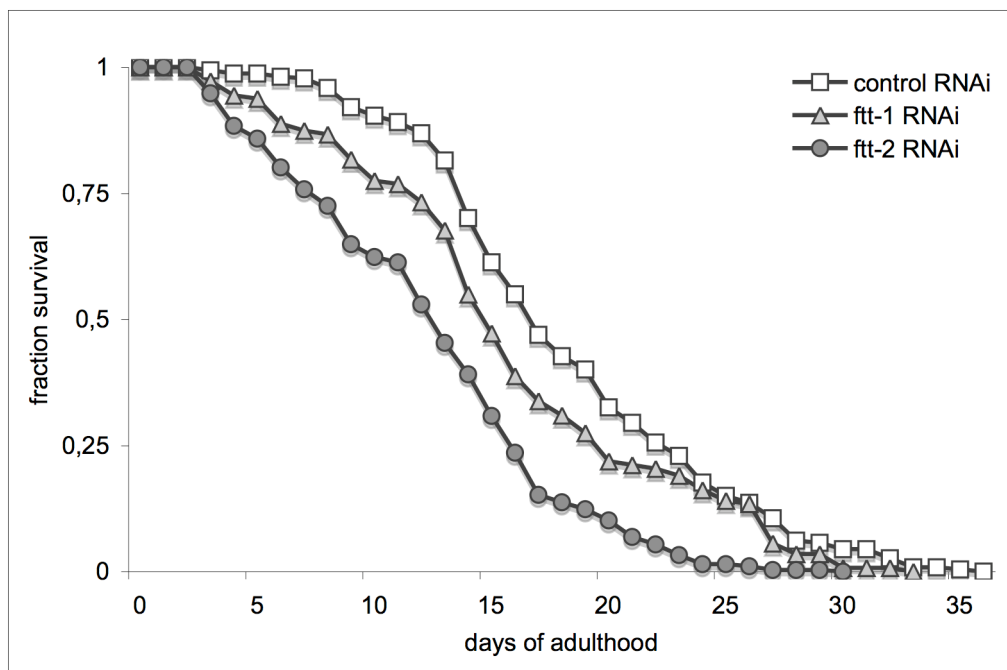


Figure 1

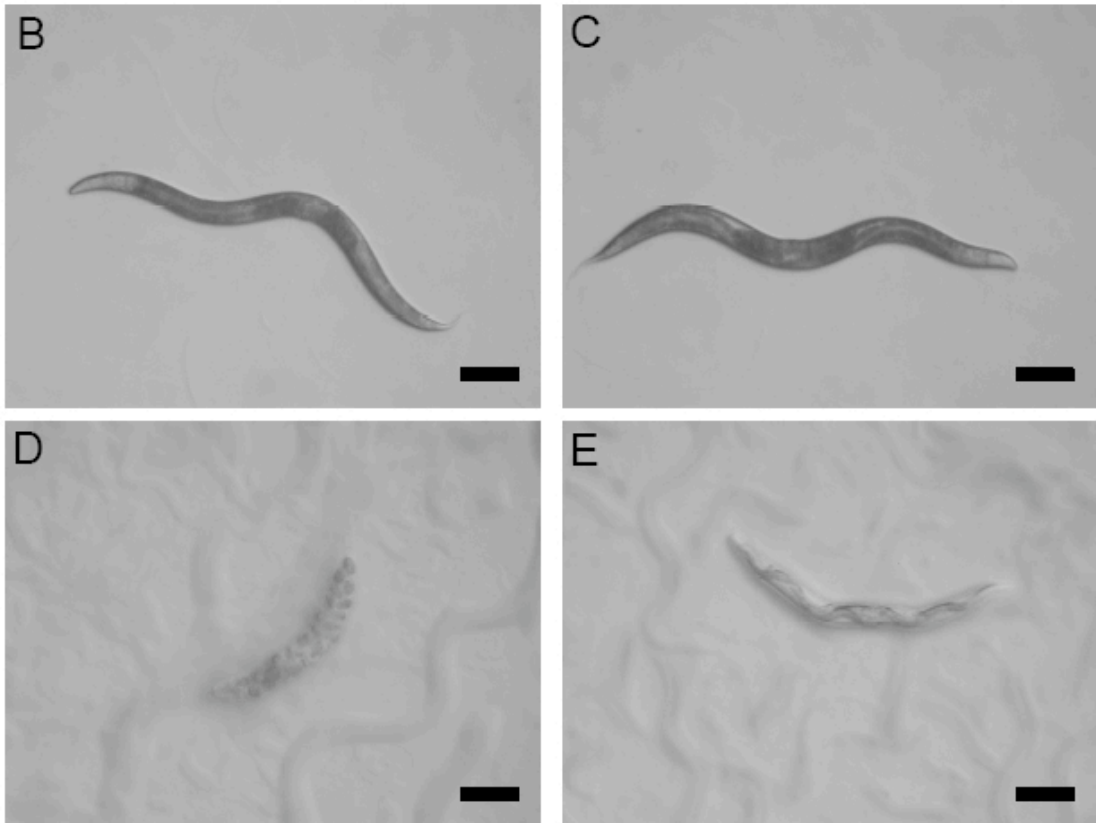


Figure 2

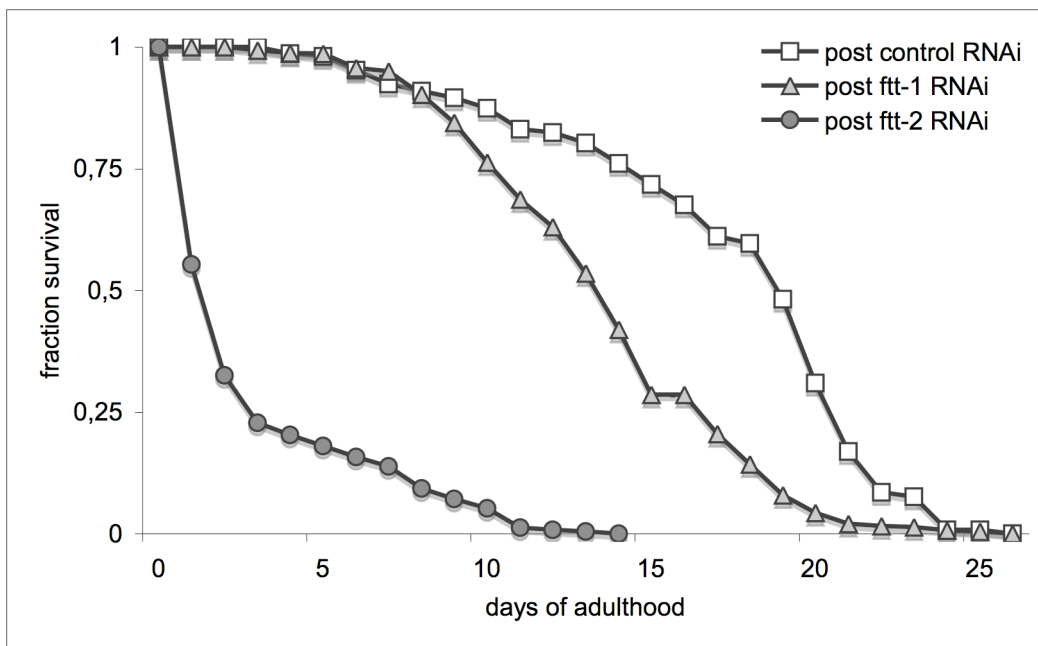


Figure 3

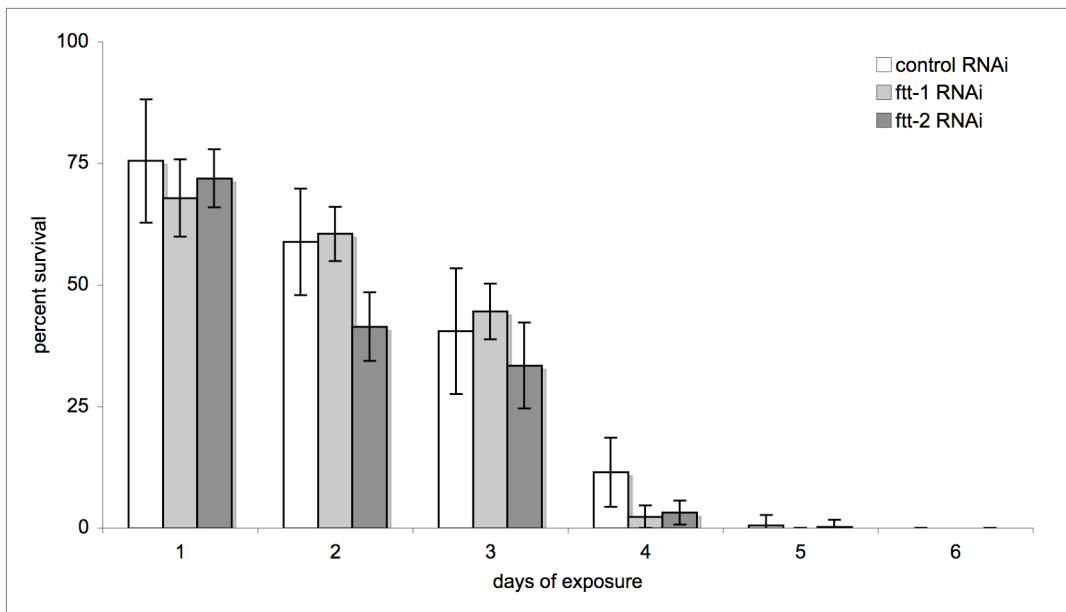


Figure 4

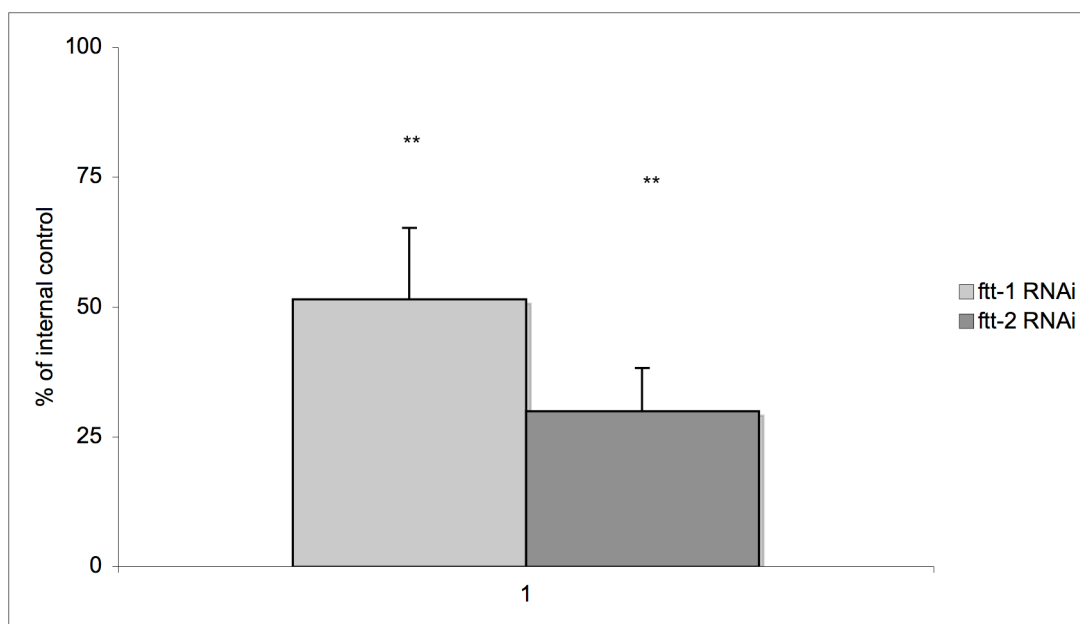


Figure 4

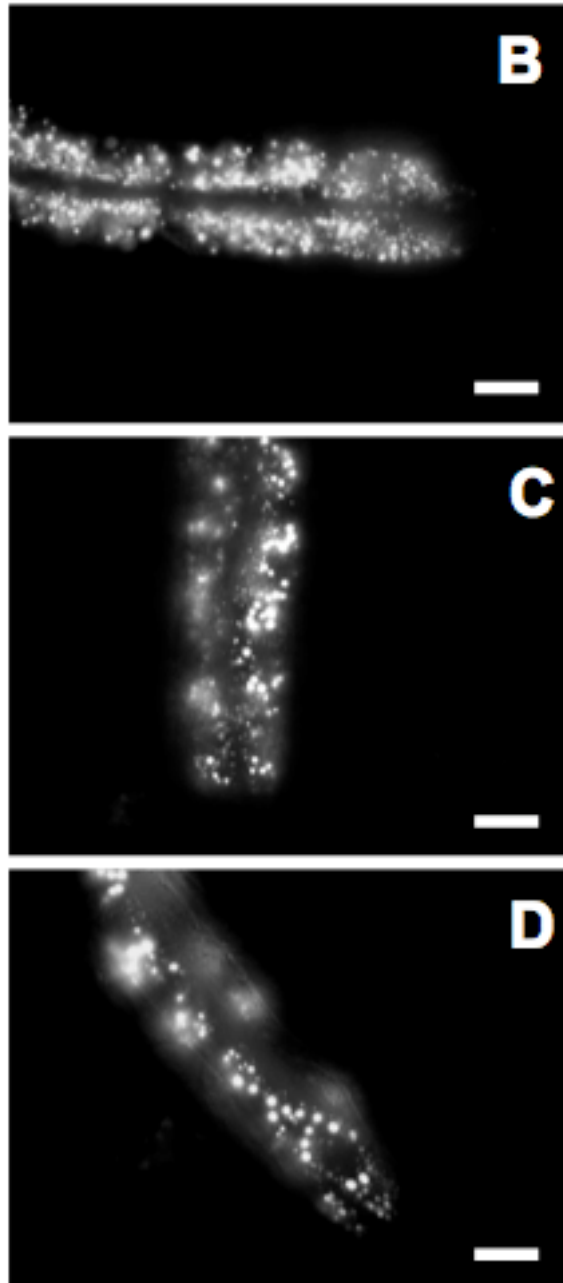


Table 1

Strain	RNAi	50th percentile (£)	Mean life span days (+ /- SD)	Max life span	code (€)	Statistics (KM analysis) (\$)	N (censored) (*)
	control	17	18,4 (0,4)	36	A	p=0,004 (B) p<0,0001 (C)	458(206)
C. Briggsae	<i>ftt-1</i>	15	16,0 (0,6)	33	B	p=0,004(A) p<0,0001 (C)	198(56)
	<i>ftt-2</i>	13	12,5 (0,3)	30	C	p<0,0001 (A) p<0,0001 (B)	372(95)

Table 2

Strain	RNAi	50th percentile	Mean life span days (+ /- SD) (@)	Max life span	code	Statistics (KM analysis) (\$)	N (censored) (*)
C. Briggsae	control	19	17,48+/-0,43	26	A	p< 0,0001 (B) p<0,0001 (C)	582(445)
	<i>ftt-1</i>	14	13,76+/-0,18	26	B	p< 0,0001(A) p<0,0001 (C)	698(179)
	<i>ftt-2</i>	2	3,03+/-0,13	14	C	p<0,0001 (A) p<0,0001 (B)	877(230)

Table 3

RNAi treatment	L4440	<i>ftt-1</i>	<i>ftt-2</i>
% of larval arrest	0	0	0
% of adults	100	100	100
Total worms scored	613	389	417

Ce travail a permis de mettre en évidence l'implication des deux protéines 14-3-3 de *C. briggsae*, Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2, dans les mécanismes conservés de la régulation de la longévité et du développement tels que nous les avons décrits chez *C. elegans*.

En effet, de la même manière que chez son congénère *C. elegans*, les protéines Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2 chez *C. briggsae* contribuent de manière positive à la longévité des animaux sauvages (voir article figure 1 A et table 1) ; de façon intéressante, nous observons également une participation prépondérante de Cbr-FTT-2 à cette régulation, comme c'est le cas chez *C. elegans*.

De façon comparable à ce que nous avons montré chez *C. elegans*, Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2 stimulent le rythme de développement et, pendant cette période, les deux protéines interviennent positivement dans des mécanismes influençant la longévité des adultes (voir article figure 2 et table 2). Cette régulation semble donc conservée entre les deux espèces.

D'autre part, le phénotype embryonnaire léthal observé sur la descendance des hermaphrodites *C. briggsae* soumis au RNAi Cbr-*ftt-1*, semblable à celui observé chez *C. elegans* dans les mêmes conditions, suggère une fonction de Cbr-FTT-1 identique à celle de FTT-1/PAR-5 chez *C. elegans*, à savoir un rôle dans la polarisation de l'embryon.

Il en va de même pour le phénotype de « bagging » observé chez les adultes après traitement par RNAi *ftt-2* pendant leur développement ; la conservation de cet effet chez *C. briggsae* et *C. elegans*, bien qu'il soit moins marqué chez ce dernier, laisse à penser que le rôle de FTT-2 est comparable chez les deux espèces.

Dans un premier temps, l'observation de phénotypes spécifiques à chacun des RNAi *ftt* nous a permis d'en déduire que, de la même façon que chez *C. elegans*, les outils RNAi utilisés ciblaient respectivement les ARN des gènes *ftt-1* et *ftt-2*. La vérification de cette spécificité et l'évaluation de l'efficacité de chaque RNAi, par PCR quantitative, est en cours.

Par ailleurs, il est connu que *C. briggsae* présente une sensibilité thermique différente de celle de *C. elegans* [409] ; par exemple, 31,5°C est la température limite à laquelle *C. briggsae*, nourri *ad libitum*, se développe normalement et forme des adultes fertiles, alors qu'à cette température *C. elegans* forme systématiquement des larves dauers [412]. Une étude récente montre que des températures supérieures à 28°C sont requises pour la formation de dauers chez des mutants *daf-2* de *C. briggsae* [413]. Nous avons réalisé des expériences d'entrée en dauer de *C. briggsae* sauvages à 22,5°C, de manière similaire à celles menés chez *C. elegans*, afin de tester l'effet des RNAi *ftt-1* et *ftt-2* sur la formation de ces larves (voir article table 3) ; vraisemblablement, la température de 22,5°C n'est pas suffisante pour permettre la mise en évidence d'une éventuelle participation des protéines Cbr-FTT à l'entrée en dauer ; depuis lors, des tests de formation de dauers ont été mis en place à 28°C dans le

but de faciliter la révélation d'un effet possible des RNAi *ftt-1* et *ftt-2*. Les expérimentations sont toujours en cours.

D'autre part, les tests de résistance au stress oxydant que nous avons réalisés ne nous ont pas permis de déterminer si les protéines FTT interviennent dans la régulation de ce phénotype chez *C. briggsae* (voir article figure 3) ; les mêmes tests conduits dans des fonds génétiques mutants pour les composants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1 nous permettront de préciser l'implication de Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2.

En ce qui concerne la mise en place des réserves lipidiques lors du développement larvaire des animaux, nous avons montré que Cbr-FTT-1 et Cbr-FTT-2 sont tous deux engagés dans l'accumulation de ces réserves (voir article figure 4 A-D), alors que seul FTT-2 présente cette fonction chez la souche sauvage N2 de *C. elegans* ; on peut supposer que Cbr-FTT-1 a « développé » cette fonction, ou bien que FTT-1 l'a perdue chez *C. elegans*.

De la même façon que chez *C. elegans*, malgré l'implication des deux protéines Cbr-FTT dans la régulation de ces divers phénotypes, la contribution de Cbr-FTT-2 dans chacun des phénotypes observés apparaît systématiquement prépondérante. Pris dans leur ensemble, les résultats de notre étude, bien que préliminaires et restant à compléter, entre autres, par l'utilisation de mutants de la voie DAF-2/Ins/IGF-1, permettent d'ores et déjà d'affirmer la conservation, chez *C. briggsae* et chez *C. elegans*, d'au moins certains mécanismes de régulation de la longévité et du métabolisme impliquant les protéines 14-3-3.

PROJETS EN COURS : résultats préliminaires

En 2004, au début de mon doctorat, mon projet de recherche initial portait sur l'analyse génomique fonctionnelle de la FSHD (dystrophie facio-scapulo-humérale) chez *Caenorhabditis elegans*. Ce projet a été échafaudé à partir des données de la littérature et des observations de collaborateurs (Dalila Laoudj et Gilles Carnac, INSERM ERI 25 -EA 4202, Equipe « Identification des mécanismes physiopathologiques de la dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) ») réalisées sur des biopsies de muscles de patients atteints et désormais publiées [414, 415].

La FSHD est une maladie neuromusculaire dégénérative autosomique dominante. Une caractéristique génétique majeure des malades est une délétion de la région sub-télomérique 4q35 du chromosome 4. Le gène codant pour le transporteur mitochondrial musculaire de l'adénine (ANT-1) est localisé en cis de ces régions sub-télomériques délétées et une surexpression de ce gène a été observée dans des biopsies de patients atteints de cette maladie [415], associée à un stress oxydant accru [416]. Une des hypothèses de travail met directement en cause l'ATP/ADP translocase mitochondriale ; en effet, la perturbation de l'expression du gène ANT-1 chez les malades atteints de FSHD suggère fortement son implication dans des perturbations de l'homéostasie des radicaux libres musculaires, pouvant de ce fait expliquer l'augmentation de la présence de protéines oxydées dans les muscles de patients atteints de FSHD ainsi que la dégénérescence musculaire progressive observée chez ces malades.

Toutefois, les méthodes d'analyse fonctionnelle classiques ne permettent pas toujours de déterminer si les effets de ces radicaux libres sur les cellules musculaires sont une conséquence ou plutôt la cause de processus de dégénérescence musculaire.

Quatre orthologues présentant environ 70% d'identité avec le gène ANT-1 humain sont présents dans le génome de *Caenorhabditis elegans* (K01H12.2, T01B11.4, T27E9.1 et W02D3.6) [15]. Le but de mon projet était d'utiliser ce modèle, et ses facilités techniques de génomique fonctionnelle, pour surexprimer ou inactiver spécifiquement les orthologues de ANT-1 afin de déterminer l'implication de ces modifications d'expression *in vivo* dans le niveau d'oxydation des protéines, dans l'intégrité des fibres et des réseaux de mitochondries musculaires ainsi que dans la fonctionnalité musculaire. De plus, une fois les animaux transgéniques obtenus, nous envisageons de tester l'effet d'anti-oxydants potentiels sur la protection ou la restauration musculaire, suite à l'exposition de divers stress oxydatifs. Autrement dit, étant donné que le nématode est couramment utilisé comme modèle d'étude de

maladies mitochondriales humaines [12], nous souhaitons modéliser au moins partiellement cette maladie génétique chez *C. elegans*, l'objectif à long terme étant l'utilisation de notre outil dans le crible de nouvelles drogues agissant sur le développement de la FSHD chez l'Homme.

La première étape limitante de ce projet était l'obtention des animaux transgéniques surexprimant les orthologues du gène ANT-1. En effet, nous envisagions d'une part de réaliser des constructions comportant le promoteur respectif de chaque orthologue suivi ou non de la séquence génomique du gène correspondant, étiquetée à l'aide d'un variant de la protéine DS Red, la « Life Time GFP » ou « GFP Timer », commercialisé par *Invitrogen*, qui possède la particularité de changer de couleur (passage du vert au rouge) dans une fenêtre temporelle de cinq heures; suite à la micro-injection de ces deux types de constructions, nous comptons accéder, grâce aux animaux transgéniques obtenus, à la détermination du tissu naturel d'expression de chacun des orthologues, à la réactivité de leur promoteur ainsi qu'au « turn-over » des protéines correspondantes.

D'autre part, nous souhaitons également surexprimer chacun des orthologues dans différents contextes génétiques permettant (i) de mesurer les variations du niveau de stress oxydant de l'animal, à savoir des souches exprimant la superoxyde dismutase ou la glutathione-S-transférase étiquetées avec la GFP, (ii) d'observer l'organisation des fibres musculaires à l'aide de souches exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la myosine (*Pmyo-3::GFP*), (iii) de suivre l'évolution du réseau mitochondrial musculaire en utilisant des souches exprimant la GFP dans les mitochondries musculaires.

Après les avoir « designées », j'ai réalisé l'ensemble des constructions nécessaires à la poursuite du projet ; cependant, la technique de microinjection de *C. elegans* n'étant pas disponible sur l'institut, faute de matériel adéquat et l'acquisition de l'appareil permettant la transformation des animaux par biolistique ayant été repoussée, nous nous sommes vus contraints de suspendre provisoirement le projet (des essais de microinjection ont toutefois été réalisés en collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Culetto (UMR 8621 Laboratoire de Génétique Moléculaire - IGM Orsay)). Depuis la fin du mois de mai 2008, nous disposons au sein de l'équipe du Biolistic® PDS-1000/He BIORAD qui va nous permettre de poursuivre le projet FSHD.

Entre temps nous nous sommes procuré au CGC un mutant de chaque orthologue de ANT-1, chacun présentant une duplication libre de la région génomique incluant un des quatre gènes, autrement dit des souches exprimant respectivement une copie supplémentaire

d'un des quatre gènes. Nous avons également obtenu du CGC le seul mutant de délétion de ANT-1 alors disponible, celui de l'orthologue T01B11.4 encore appelé *tag-16*, exprimé dans le muscle [417], la souche étant désignée VC652. Nous avons alors procédé à la recherche d'un phénotype moteur chez chacun de ces cinq mutants ; pour cela, nous avons observé le déplacement spontané des animaux vers l'avant ou vers l'arrière et après stimulation mécanique à l'aide d'une anse de platine ; alors qu'aucun des animaux portant une duplication ne présentait d'anomalies motrices, le mutant de délétion VC652 a manifesté un phénotype « uncoordinated » ou *unc*, bien que peu pénétrant (environ 6%), visible à partir du stade L4. Ce phénotype consistait en une altération de la régularité de la sinusoïde décrite par l'animal en mouvement et par une difficulté à reculer en réponse à une stimulation au niveau de la tête.

Au vu des difficultés techniques rencontrées pour la réalisation des souches transgéniques surexprimant les orthologues de ANT-1, mentionnées précédemment, nous avons repris l'hypothèse de travail considérant ANT-1 comme un candidat de choix dans le déterminisme des altérations liées à la FSHD, mais nous avons réorienté le projet de recherche. Chez *C. elegans*, il est connu que différentes altérations de l'expression de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale affectent la longévité et la sensibilité au stress oxydant des animaux [29, 418, 419]. Nous avons choisi d'étudier le lien entre stress oxydant, organisation du réseau mitochondrial musculaire, dégénérescence des fibres musculaires et longévité, en nous basant sur une caractérisation de ces paramètres chez le mutant VC652. Ce projet est toujours en cours et seuls quelques résultats sont présentés ci-après.

Etant donné que la protéine ANT-1 se localise au niveau de la mitochondrie et que l'orthologue T01B11.4/*tag-316* est exprimé dans les cellules musculaires de *C. elegans*, nous avons recherché si l'architecture du réseau mitochondrial de ces cellules était perturbée dans la souche VC652, partiellement délétée pour le gène *tag-316*. Pour ce faire, j'ai réalisé des croisements visant à introduire un transgène exprimant la protéine GFP dans les mitochondries musculaires chez le mutant *tag-316*, ainsi que chez la souche MN1 (partiellement délétée pour le gène *ppt-1* codant pour la palmitoyl-thio-esterase) caractérisée par une longévité normale, un phénotype moteur normal et des réseaux mitochondriaux musculaires perturbés [420], servant de contrôle positif dans nos expériences. Afin de valider les souches obtenues, j'ai vérifié par PCR génomique la présence du fragment partiellement délété de *tag-316* dans la souche transgénique baptisée SG8 ou de *ppt-1* dans la souche transgénique baptisée SG7. L'observation par microscopie à fluorescence nous a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les souches obtenues et vis à vis du

contrôle (**Figure 1**) : alors que les N2 possèdent un réseau régulier et allongé de mitochondries le long des fibres contractiles, celui des VC652 est plus désorganisé (résultat confirmé depuis lors par l'équipe d'Emmanuel Culetto sur des animaux soumis à un traitement RNAi contre chacun des quatre orthologues de ANT-1 [421]) ; celui des MN1 est encore plus affecté : il est non seulement moins réticulé mais il est également formé de mitochondries plus denses, comme rapporté par Porter *et al.* [420].

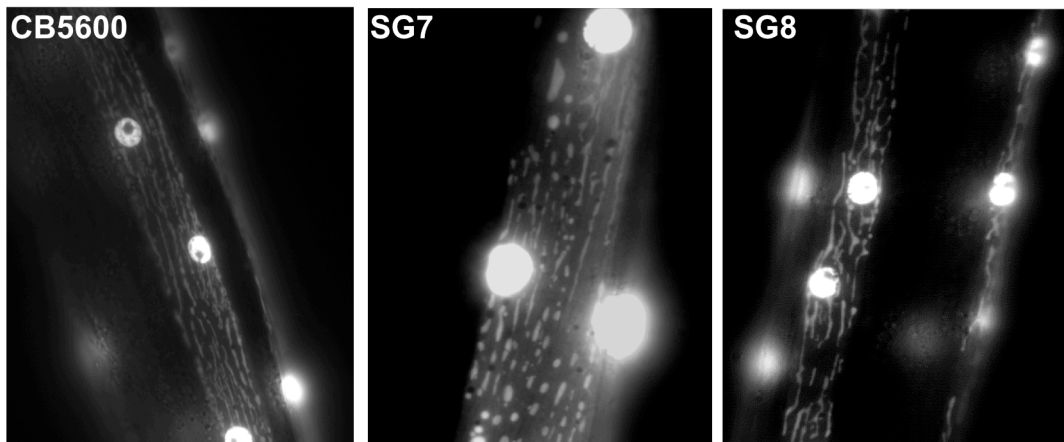


Figure 1: observation du réseau de mitochondries musculaires de larves L4 des souches CB5600, SG7 et SG8.

La souche CB5600 possède un fond génétique sauvage et exprime le transgène *cIs4251*[*myo-3::Ngfp-lacZ*; *myo-3::Mtgfp*]; la souche SG7 résulte du croisement de la souche MN1 (*ppt-1*) avec CB5600; la souche SG8 est issue du croisement de la souche CB5600 avec la souche VC652 (*tag-316*).

Les photos représentent la visualisation du réseau mitochondrial musculaire (grossi 1000 fois) en épifluorescence, les noyaux des cellules musculaires étant également marqués grâce à la GFP. Alors que le réseau de CB5600 est allongé et régulier, celui de SG7 présente une réticulation moindre et des mitochondries plus volumineuses. Celui de SG8, bien qu'altéré par rapport à celui de la souche contrôle apparaît moins désorganisé que celui de SG7.

Afin de déterminer si l'antiport ANT-1 est impliqué dans le processus de longévité, comme le sont d'autres composants de la chaîne respiratoire mitochondriale, nous avons réalisé des expériences de longévité sur des animaux sauvages N2, sur les mutants MN1 (*ppt-1*) et VC652 (*tag-316*) ; alors que nos expériences étaient en cours, le mutant VC620 (*tag-194*), portant une délétion partielle de l'orthologue de ANT-1 W02D3.6, a été disponible au CGC, nous l'avons donc intégré à notre étude. Les expériences de longévité ont été conduites à 20°C sur des adultes des souches citées précédemment en présence de *E. coli* OP50

(nourriture classique). Plusieurs expériences indépendantes ont révélé une durée de vie moyenne significativement accrue pour les deux mutants de ANT-1 (VC620 : 22,8 jours ; VC652 : 24,5 jours) par rapport au contrôle sauvage N2 (19,3 jours) (**Figure 2 et Table 1**). En revanche, la longévité du mutant MN1 n'a présenté aucune variation significative vis à vis de ce même contrôle (19,3 jours).

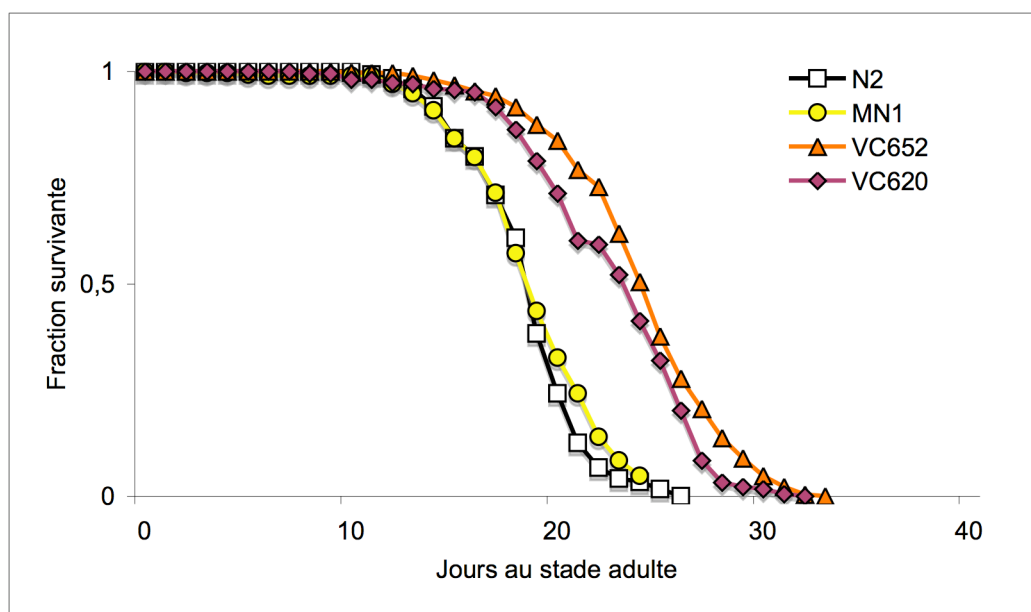


Figure 2: expériences de longévité conduites à 20°C sur des adultes des souches N2 et mutantes MN1 (*ppt-1*), VC652 (*tag-316*) et VC620 (*tag-194*).

Chaque courbe représente le cumul d'au moins quatre expériences indépendantes. La longévité des MN1 est comparable à celle des N2; les deux mutants ANT-1 présentent une longévité accrue significativement différente des deux souches précédentes (voir Table 1).

Souche	50ième percentile (jours) (€)	Durée de vie moyenne (jours +/- ET)	Durée de vie maximale (jours)	code (€)	Analyse statistique (KM)(\$)	N (censurés) (*)
N2 (wt)	19	19,3 +/-0,3	33	A	p=0,946 (B) p<0,0001 (C) p<0,0001 (D)	197(7)
MN1 (<i>ppt-1</i>)	19	19,3 +/-0,2	32	B	p=0,946 (A) p<0,0001 (C) p<0,0001 (D)	611(6)
VC652 (<i>tag-316</i>)	25	24,5 +/-0,2	34	C	p<0,0001 (A) p<0,0001 (B) p<0,0001 (D)	532(27)
VC620 (<i>tag-194</i>)	24	22,8 +/-0,2	32	D	p<0,0001 (A) p<0,0001 (B) p<0,0001 (C)	377(11)

Table 1: données de longévité et analyses statistiques des expériences de longévité conduites à 20°C sur des adultes des souches N2 et mutantes MN1 (*ppt-1*), VC652 (*tag-316*) et VC620 (*tag-194*). Le logiciel de statistiques XLSTAT-life (Addinsoft, New York, NY, USA) a été utilisé pour l'analyse de Kaplan–Meier et les différences entre les courbes de survie ont été calculées grâce au test de LogRank avec un seuil de signification de 5%.

(£): le 50^{ième} percentile représente le temps où 50% de la population est encore vivante; (\$) : probabilité de différence significative avec les expériences de longévité indiquées entre parenthèses; (*) : nombre total d'animaux analysés, nombre d'animaux censurés entre parenthèses.

Ainsi une diminution du niveau d'expression d'un seul des deux antiports TAG-316 ou TAG-194 suffit à affecter la longévité du nématode, suggérant que cette perte de fonction n'est pas compensée par l'expression des autres orthologues et, par conséquent, que chacune de ces protéines occupe une fonction essentielle dans la régulation de la durée de vie des animaux. D'autre part, ces résultats montrent que la modification de la morphologie mitochondriale n'est pas forcément corrélée à la durée de vie de l'animal, étant donné que le profil le plus affecté est celui de la souche MN1 qui présente pourtant une durée de vie comparable à celle des N2. Il serait intéressant de caractériser quelles sont les conséquences d'une telle altération sur l'activité des mitochondries.

Lors des observations de la structure du réseau de mitochondries, nous avons pu noter chez les trois souches considérées que l'organisation du réseau de mitochondries était plus ou moins variable d'une cellule musculaire à une autre, ce phénotype étant particulièrement exacerbé chez les mutants VC652. Bien que ce phénomène puisse en partie être expliqué par le fait que toutes les cellules musculaires ne sont pas issues du même lignage [422] et n'ont donc pas hérité du même « pool » de mitochondries, il se pourrait que le niveau d'expression de l'orthologue de ANT-1, *tag-316*, influence l'apparition de modifications morphologiques chez ces mutants par rapport aux animaux contrôles et à la souche MN1. Toutefois ces observations demeurent préliminaires et seront complétées par une caractérisation des réseaux mitochondriaux de l'ensemble des cellules constituant chacun des quatre quadrants musculaires. En effet, nous envisageons la réalisation d'une reconstruction en trois dimensions de ces réseaux chez les souches CB5600, SG7 et SG8, afin, d'une part, de déterminer la filiation des différentes cellules présentant des désordres similaires du réseau mitochondrial et d'autre part, de mesurer et de comparer le volume occupé par les mitochondries musculaires dans chacune des souches.

Différents éléments de la chaîne respiratoire mitochondriale sont connus pour leur capacité à réguler la longévité et la résistance au stress [423]. Suite aux expériences de longévité, nous nous sommes intéressés à la résistance des mutants ANT-1 vis à vis des stress thermique et oxydant. D'une part, nous avons exposé des adultes des souches N2, MN1, VC620 et VC652 à un stress thermique de 2,5 h à 37°C, puis nous avons observé la survie des

animaux replacés à 20°C ; malheureusement, ces premiers tests ont révélé des effets non reproductibles et doivent donc être répétés. Pour ce qui est du stress oxydant, chaque souche a été placée en culture liquide en présence de 10 mM de ménadione, à 20°C, au premier jour du stade adulte et observée les jours suivants. Ces tests n'ont révélé aucune différence significative de survie des souches MN1 et VC652 par rapport à la souche sauvage N2 ; en revanche, VC620 présente une sensibilité accrue à J3 et J4 (**Figure 3**).

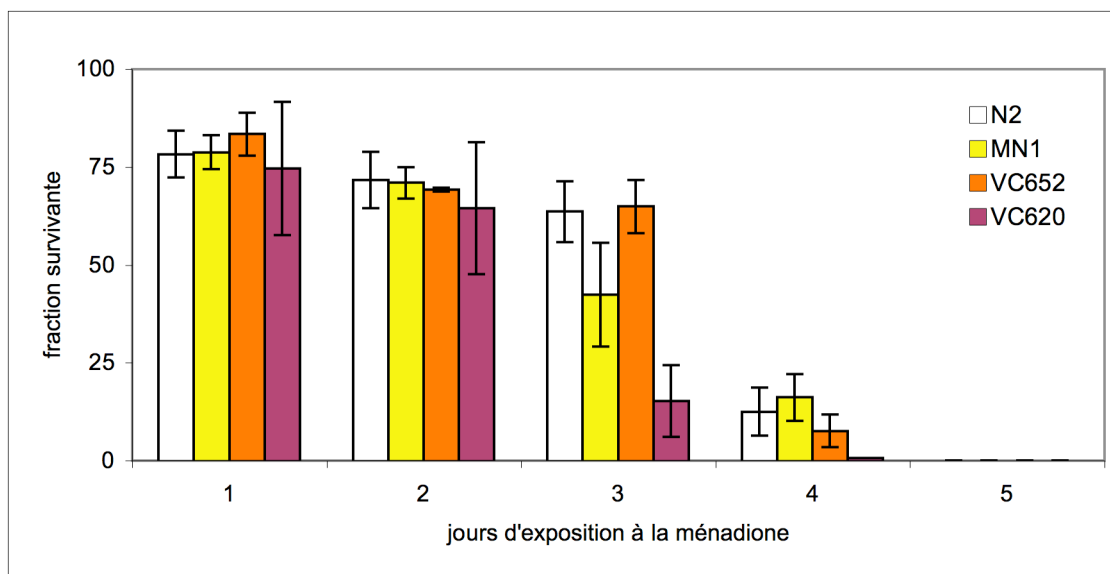


Figure 3: test de résistance à 10mM de ménadione conduit à 20°C sur des adultes des souches N2 et mutantes MN1 (*ppt-1*), VC652 (*tag-316*) et VC620 (*tag-194*).

Chaque histogramme représente au moins quatre expériences indépendantes.

Les différents mutants testés ne présentent pas de variation significative de la résistance au stress oxydant par rapport au contrôle, exception faite de VC620 qui semble plus sensible à J3 et J4. (effectifs: N2 = 184; MN1 = 217; VC620 = 138; VC652 = 211)

De façon générale, il semblerait que la désorganisation du réseau mitochondrial musculaire n'affecte pas la sensibilité des animaux au stress oxydant. Il serait intéressant de déterminer si, en revanche, elle influence l'état de stress oxydant intrinsèque des souches MN1, VC620 et VC652 ; pour cela, nous proposons d'intégrer par croisement les transgènes de la superoxyde dismutase ou de la glutathione-S-transferase étiquetées avec la GFP dans chacune de ces souches et d'évaluer l'expression de ces transgènes par mesure de la fluorescence. D'autre part, la quantification des protéines oxydées nous renseignera également sur l'état oxydatif des animaux.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici semble indiquer qu'il n'existe pas de corrélation systématique entre longévité accrue et augmentation de la résistance au stress, ni entre longévité accrue et morphologie normale du réseau mitochondrial. L'obtention des animaux transgéniques surexprimant les orthologues de ANT-1 et la caractérisation chez ces individus des phénotypes de longévité, de résistance au stress et de morphologie mitochondriale seront d'une aide précieuse dans la confirmation de nos résultats sur les mutants de délétion.

BIBLIOGRAPHIE

1. Crick, F.H., et al., *General nature of the genetic code for proteins*. Nature, 1961. **192**: p. 1227-32.
2. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
3. Sulston, J.E., *Neuronal cell lineages in the nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1983. **48 Pt 2**: p. 443-52.
4. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
5. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
6. Horvitz, H.R., S. Shaham, and M.O. Hengartner, *The genetics of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. **59**: p. 377-85.
7. Hedgecock, E.M., J.E. Sulston, and J.N. Thomson, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-9.
8. Jeanteur, P. and S. Galas, [2002 Nobel Prize in Physiology and Medicine: from nematodes to programmed cell death]. Bull Cancer, 2002. **89**(10): p. 838.
9. Labouesse, M., "Mourir ou ne pas mourir" telle est la question et comment un minuscule petit ver y répondit. Medecine/Sciences, 2002. **18**: p. 1157-9.
10. Finch, C.E. and G. Ruvkun, *The genetics of aging*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 435-62.
11. Olsen, A., M.C. Vantipalli, and G.J. Lithgow, *Using Caenorhabditis elegans as a model for aging and age-related diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 120-8.
12. Ventura, N., S.L. Rea, and R. Testi, *Long-lived C. elegans Mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases*. Exp Gerontol, 2006.
13. Segalat, L., et al., *CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy*. Exp Cell Res, 2005. **302**(2): p. 170-9.
14. Schnabel, R., et al., *Assessing normal embryogenesis in Caenorhabditis elegans using a 4D microscope: variability of development and regional specification*. Dev Biol, 1997. **184**(2): p. 234-65.
15. Consortium, T.C.e.S., *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science, 1998. **282**: p. 2012-8.
16. Schaffitzel, E. and M. Hertweck, *Recent aging research in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(6): p. 557-63.
17. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
18. Czech, M.P., *Insulin's expanding control of forkheads*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11198-200.
19. Kenyon, C., *A conserved regulatory system for aging*. Cell, 2001. **105**(2): p. 165-8.
20. Martinez, D.E., *Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra*. Exp Gerontol, 1998. **33**(3): p. 217-25.
21. Kirkwood, T.B., *Understanding the odd science of aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 437-47.
22. Balcombe, N.R. and A. Sinclair, *Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(6): p. 835-49.
23. Vina, J., C. Borras, and J. Miquel, *Theories of ageing*. IUBMB Life, 2007. **59**(4-5): p. 249-54.
24. Medvedev, Z.A., *An attempt at a rational classification of theories of ageing*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1990. **65**(3): p. 375-98.
25. Gems, D., *Nematode ageing: Putting metabolic theories to the test*. Curr Biol, 1999. **9**(16): p. R614-6.

26. Hercus, M.J., V. Loeschcke, and S.I. Rattan, *Lifespan extension of Drosophila melanogaster through hormesis by repeated mild heat stress*. Biogerontology, 2003. **4**(3): p. 149-56.
27. Lakowski, B. and S. Hekimi, *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13091-6.
28. Braeckman, B.P., et al., *Apparent uncoupling of energy production and consumption in long-lived Clk mutants of Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 1999. **9**(9): p. 493-6.
29. Felkai, S., et al., *CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode Caenorhabditis elegans*. Embo J, 1999. **18**(7): p. 1783-92.
30. Herndon, L.A., et al., *Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans*. Nature, 2002. **419**(6909): p. 808-14.
31. Weismann, A., *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Clarendon Press, Oxford, 1889.
32. Medawar, P.B., *An Unsolved Problem of Biology*. London: H. K. Lewis, 1952.
33. Partridge, L. and D. Gems, *The evolution of longevity*. Curr Biol, 2002. **12**(16): p. R544-6.
34. Williams, G., *Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence* Evolution, 1957.
35. Kirkwood, T.B., *Evolution of ageing*. Nature, 1977. **270**(5635): p. 301-4.
36. Kirkwood, T.B., *Understanding ageing from an evolutionary perspective*. J Intern Med, 2008. **263**(2): p. 117-27.
37. Kirkwood, T.B., *Human senescence*. Bioessays, 1996. **18**(12): p. 1009-16.
38. Kirkwood, T.B., *Changing complexity in aging: a metric not an hypothesis*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(1): p. 21-2.
39. Austad, S.N., *Retarded aging rate in an insular population of opossums*. Journal of Zoology, 1993. **229**: p. 695-708.
40. Nystrom, T., *A bacterial kind of aging*. PLoS Genet, 2007. **3**(12): p. e224.
41. Stewart, E.J., et al., *Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division*. PLoS Biol, 2005. **3**(2): p. e45.
42. Le Bourg, E., *Does reproduction decrease longevity in human beings?* Ageing Res Rev, 2007. **6**(2): p. 141-9.
43. Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, *Defining hormesis*. Hum Exp Toxicol, 2002. **21**(2): p. 91-7.
44. Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, *Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis*. Crit Rev Toxicol, 2001. **31**(4-5): p. 353-424.
45. Gems, D. and L. Partridge, *Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger"*. Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 200-3.
46. Parsons, P.A., *The ecological stress theory of aging and hormesis: an energetic evolutionary model*. Biogerontology, 2007. **8**(3): p. 233-42.
47. Muller, F.L., et al., *Trends in oxidative aging theories*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(4): p. 477-503.
48. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol., 1956. **11**: p. 298-300.
49. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
50. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
51. Miquel, J.a.F., J. E., *Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging*. in Free Radicals, Aging and Degenrative Diseases, (Johnson, J. E., Jr, Harman, D., Walford, R., and Miquel, J., eds), 1986: p. pp.51-74.

52. Merry, B.J., *Dietary restriction in rodents--delayed or retarded ageing?* Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 951-9.
53. Hamilton, M.L., et al., *Does oxidative damage to DNA increase with age?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10469-74.
54. Szilard, L., *A theory of aging.* Nature, 1959. **184**: p. 956-958.
55. Gensler, H.L. and H. Bernstein, *DNA damage as the primary cause of aging.* Q Rev Biol, 1981. **56**(3): p. 279-303.
56. Martin, G.M. and J. Oshima, *Lessons from human progeroid syndromes.* Nature, 2000. **408**(6809): p. 263-6.
57. Shen, J.C. and L.A. Loeb, *Werner syndrome exonuclease catalyzes structure-dependent degradation of DNA.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(17): p. 3260-8.
58. Shen, J.C. and L.A. Loeb, *The Werner syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases.* Trends Genet, 2000. **16**(5): p. 213-20.
59. Bohr, V.A., et al., *Pathways defective in the human premature aging disease Werner syndrome.* Biogerontology, 2002. **3**(1-2): p. 89-94.
60. Henning, K.A., et al., *The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF.* Cell, 1995. **82**(4): p. 555-64.
61. Hastay, P., et al., *Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?* Science, 2003. **299**(5611): p. 1355-9.
62. Dolle, M.E. and J. Vijg, *Genome dynamics in aging mice.* Genome Res, 2002. **12**(11): p. 1732-8.
63. Esposito, D., et al., *Chromosomes of older humans are more prone to aminopterin-induced breakage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1302-6.
64. Moorhead, P.S., et al., *Standards of karyology for human diploid cells.* J Biol Stand, 1974. **2**(2): p. 95-101.
65. Shawi, M. and C. Autexier, *Telomerase, senescence and ageing.* Mech Ageing Dev, 2008. **129**(1-2): p. 3-10.
66. Kappei, D. and J.A. Londono-Vallejo, *Telomere length inheritance and aging.* Mech Ageing Dev, 2008. **129**(1-2): p. 17-26.
67. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.* Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
68. Cawthorn, R.M., Smith, K. R. , O'Brien, E. , Sivatchenko, A. , Kerber, R. A. , *Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years and older.* Lancet, 2003. **361**: p. 393-395.
69. Forsyth, N.R., W.E. Wright, and J.W. Shay, *Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again.* Differentiation, 2002. **69**(4-5): p. 188-97.
70. Denham, M., et al., *Stem cells: an overview.* Curr Protoc Cell Biol, 2005. **Chapter 23**: p. Unit 23 1.
71. Baird, D.M., *Telomeres II.* Exp Gerontol, 2008. **43**(1): p. 15-9.
72. Mobbs, C.V., *Not wisely but too well: aging as a cost of neuroendocrine activity.* Sci Aging Knowledge Environ, 2004. **2004**(35): p. pe33.
73. Kennedy, B.K., *The genetics of ageing: insight from genome-wide approaches in invertebrate model organisms.* J Intern Med, 2008. **263**(2): p. 142-52.
74. Houthoofd, K. and J.R. Vanfleteren, *Public and private mechanisms of life extension in Caenorhabditis elegans.* Mol Genet Genomics, 2007. **277**(6): p. 601-17.
75. Kamath, R.S., et al., *Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi.* Nature, 2003. **421**(6920): p. 231-7.
76. Rattan, S.I., *Gerontogenes: real or virtual?* FASEB J, 1995. **9**(2): p. 284-6.
77. McCay, C.M., Crolwell, M. and Maynard, L., , *The effect of retarded growth upon the length of the life span and ultimate body size.* J. Nutr. , 1935. **10**: p. 63-79.

78. Johnson, T.E., *Caenorhabditis elegans* 2007: *The premier model for the study of aging*. Exp Gerontol, 2007.
79. Johnson, T.E. and W.B. Wood, *Genetic analysis of life-span in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(21): p. 6603-7.
80. Klass, M.R., *A method for the isolation of longevity mutants in the nematode Caenorhabditis elegans and initial results*. Mech Ageing Dev, 1983. **22**(3-4): p. 279-86.
81. Larsen, P.L., P.S. Albert, and D.L. Riddle, *Genes that regulate both development and longevity in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1995. **139**(4): p. 1567-83.
82. Kamath, R.S. and J. Ahringer, *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans*. Methods, 2003. **30**(4): p. 313-21.
83. Ashrafi, K., et al., *Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes*. Nature, 2003. **421**(6920): p. 268-72.
84. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
85. Guarente, L. and C. Kenyon, *Genetic pathways that regulate ageing in model organisms*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 255-62.
86. Ayyadevara, S., et al., *Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants*. Aging Cell, 2008. **7**(1): p. 13-22.
87. Ayyadevara, S., et al., *Life span and stress resistance of Caenorhabditis elegans are differentially affected by glutathione transferases metabolizing 4-hydroxynon-2-enal*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(2): p. 196-205.
88. Baumeister, R., E. Schaffitzel, and M. Hertweck, *Endocrine signaling in Caenorhabditis elegans controls stress response and longevity*. J Endocrinol, 2006. **190**(2): p. 191-202.
89. Berdichevsky, A. and L. Guarente, *A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2588-91.
90. Wolff, S., et al., *SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity*. Cell, 2006. **124**(5): p. 1039-53.
91. Larsen, P.L., *Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8905-9.
92. Scott, B.A., M.S. Avidan, and C.M. Crowder, *Regulation of hypoxic death in C. elegans by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2388-91.
93. Lithgow, G.J., et al., *Thermotolerance of a long-lived mutant of Caenorhabditis elegans*. J Gerontol, 1994. **49**(6): p. B270-6.
94. Lithgow, G.J., et al., *Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7540-4.
95. Hsu, A.L., C.T. Murphy, and C. Kenyon, *Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1142-5.
96. Murakami, S. and T.E. Johnson, *A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1996. **143**(3): p. 1207-18.
97. Barsyte, D., D.A. Lovejoy, and G.J. Lithgow, *Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of Caenorhabditis elegans*. FASEB J, 2001. **15**(3): p. 627-34.
98. Mair, W., M.D. Piper, and L. Partridge, *Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in Drosophila*. PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e223.
99. Smith, E.D., et al., *Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in Caenorhabditis elegans*. BMC Dev Biol, 2008. **8**(1): p. 49.

100. Klass, M.R., *Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span*. Mech Ageing Dev, 1977. **6**(6): p. 413-29.
101. Masoro, E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 913-22.
102. Panowski, S.H., et al., *PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of C. elegans*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 550-5.
103. Bishop, N.A. and L. Guarente, *Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in C. elegans*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 545-9.
104. Greer, E.L., et al., *An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in C. elegans*. Curr Biol, 2007. **17**(19): p. 1646-56.
105. Houthoofd, K., et al., *Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2003. **38**(9): p. 947-54.
106. Kaeberlein, T.L., et al., *Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by complete removal of food*. Aging Cell, 2006. **5**(6): p. 487-94.
107. Lee, G.D., et al., *Dietary deprivation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2006. **5**(6): p. 515-24.
108. Vellai, T., et al., *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 620.
109. Apfeld, J., et al., *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3004-9.
110. Meissner, B., et al., *Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36739-45.
111. Fei, Y.J., et al., *Relevance of NAC-2, an Na⁺-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 1): p. 191-8.
112. Houthoofd, K., et al., *Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1371-8.
113. Nehrke, K., *A reduction in intestinal cell pH_i due to loss of the Caenorhabditis elegans Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 increases life span*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44657-66.
114. Houthoofd, K. and J.R. Vanfleteren, *The longevity effect of dietary restriction in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 1026-31.
115. Fontana, L., et al., *Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6659-63.
116. Michels, K.B. and A. Ekblom, *Caloric restriction and incidence of breast cancer*. JAMA, 2004. **291**(10): p. 1226-30.
117. Guarente, L. and F. Picard, *Calorie restriction--the SIR2 connection*. Cell, 2005. **120**(4): p. 473-82.
118. Rine, J. and I. Herskowitz, *Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1987. **116**(1): p. 9-22.
119. Guarente, L., *Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging*. Genes Dev, 2000. **14**(9): p. 1021-6.
120. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
121. Wang, Y. and H.A. Tissenbaum, *Overlapping and distinct functions for a Caenorhabditis elegans SIR2 and DAF-16/FOXO*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(1): p. 48-56.
122. Viswanathan, M., et al., *A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining C. elegans life span*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 605-15.
123. Tatar, M., *SIR2 calls upon the ER*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 281-2.

124. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
125. Long, X., et al., *TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation*. Curr Biol, 2002. **12**(17): p. 1448-61.
126. Jia, K., D. Chen, and D.L. Riddle, *The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span*. Development, 2004. **131**(16): p. 3897-906.
127. Hansen, M., et al., *Lifespan extension by conditions that inhibit translation in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(1): p. 95-110.
128. Henderson, S.T., M. Bonafe, and T.E. Johnson, *daf-16 protects the nematode Caenorhabditis elegans during food deprivation*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(5): p. 444-60.
129. Curtis, R., G. O'Connor, and P.S. DiStefano, *Aging networks in Caenorhabditis elegans: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 119-26.
130. Greer, E.L., et al., *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30107-19.
131. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
132. Pan, K.Z., et al., *Inhibition of mRNA translation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(1): p. 111-9.
133. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
134. Lum, J.J., R.J. DeBerardinis, and C.B. Thompson, *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 439-48.
135. Kang, C., Y.J. You, and L. Avery, *Dual roles of autophagy in the survival of Caenorhabditis elegans during starvation*. Genes Dev, 2007. **21**(17): p. 2161-71.
136. Melendez, A., et al., *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1387-91.
137. Hars, E.S., et al., *Autophagy regulates ageing in C. elegans*. Autophagy, 2007. **3**(2): p. 93-5.
138. Morck, C. and M. Pilon, *C. elegans feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy*. BMC Dev Biol, 2006. **6**: p. 39.
139. Jia, K. and B. Levine, *Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in C. elegans*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 597-9.
140. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
141. Hansen, M., et al., *A Role for Autophagy in the Extension of Lifespan by Dietary Restriction in C. elegans*. PLoS Genet, 2008. **4**(2): p. e24.
142. Toth, M.L., et al., *Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in caenorhabditis elegans*. Autophagy, 2008. **4**(3): p. 330-8.
143. Chen, D. and D.L. Riddle, *Function of the PHA-4/FOXA transcription factor during C. elegans post-embryonic development*. BMC Dev Biol, 2008. **8**(1): p. 26.
144. An, J.H. and T.K. Blackwell, *SKN-1 links C. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1882-93.
145. Bowerman, B., B.A. Eaton, and J.R. Priess, *skn-1, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early C. elegans embryo*. Cell, 1992. **68**(6): p. 1061-75.

146. Maduro, M.F., et al., *Restriction of mesendoderm to a single blastomere by the combined action of SKN-1 and a GSK-3beta homolog is mediated by MED-1 and -2 in C. elegans*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 475-85.
147. An, J.H., et al., *Regulation of the Caenorhabditis elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16275-80.
148. Tullet, J.M., et al., *Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1025-38.
149. Sinclair, D.A., *Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 987-1002.
150. Szewczyk, N.J., et al., *Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in C. elegans under dietary restriction*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 20): p. 4129-39.
151. Hsin, H. and C. Kenyon, *Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans*. Nature, 1999. **399**(6734): p. 362-6.
152. Crawford, D., N. Libina, and C. Kenyon, *Caenorhabditis elegans integrates food and reproductive signals in lifespan determination*. Aging Cell, 2007. **6**(5): p. 715-21.
153. Kaiser, J., *Hormesis. Sipping from a poisoned chalice*. Science, 2003. **302**(5644): p. 376-9.
154. Masoro, E.J., *Hormesis is the beneficial action resulting from the response of an organism to a low-intensity stressor*. Hum Exp Toxicol, 2000. **19**(6): p. 340-1.
155. Rattan, S.I., *Aging, anti-aging, and hormesis*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(4): p. 285-9.
156. Minois, N., *Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress*. Biogerontology, 2000. **1**(1): p. 15-29.
157. Petin, V.G., et al., *[Some effects of radiation hormesis for bacterial and yeast cells]*. Radiats Biol Radioecol, 2003. **43**(2): p. 176-8.
158. Le Bourg, E., *A review of the effects of microgravity and of hypergravity on aging and longevity*. Exp Gerontol, 1999. **34**(3): p. 319-36.
159. Le Bourg, E., et al., *Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in Drosophila melanogaster*. Biogerontology, 2001. **2**(3): p. 155-64.
160. Le Bourg, E., *Hormetic protection of Drosophila melanogaster middle-aged male flies from heat stress by mildly stressing them at young age*. Naturwissenschaften, 2005. **92**(6): p. 293-6.
161. Minois, N. and E. Le Bourg, *Resistance to stress as a function of age in Drosophila melanogaster living in hypergravity*. Mech Ageing Dev, 1999. **109**(1): p. 53-64.
162. Shevchuk, N.A. and S. Radoja, *Possible stimulation of anti-tumor immunity using repeated cold stress: a hypothesis*. Infect Agent Cancer, 2007. **2**: p. 20.
163. Ren, H., et al., *Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation*. Cell Immunol, 2006. **244**(1): p. 50-6.
164. Hunt, D. and S.N. Rai, *Testing threshold and hormesis in a random effects dose-response model applied to developmental toxicity data*. Biom J, 2005. **47**(3): p. 319-28.
165. Cypser, J.R., P. Tedesco, and T.E. Johnson, *Hormesis and aging in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 935-9.
166. Yanase, S. and N. Ishii, *Hyperoxia Exposure Induced Hormesis Decreases Mitochondrial Superoxide Radical Levels via Ins/IGF-1 Signaling Pathway in a Long-lived age-1 Mutant of Caenorhabditis elegans*. J Radiat Res (Tokyo), 2008.
167. Butov, A., et al., *Hormesis and debilitation effects in stress experiments using the nematode worm Caenorhabditis elegans: the model of balance between cell damage and HSP levels*. Exp Gerontol, 2001. **37**(1): p. 57-66.

168. Wu, D., et al., *Visualizing hidden heterogeneity in isogenic populations of C. elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(3): p. 261-70.
169. Cypser, J.R. and T.E. Johnson, *Multiple stressors in Caenorhabditis elegans induce stress hormesis and extended longevity*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2002. **57**(3): p. B109-14.
170. McElwee, J.J., et al., *Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms*. Genome Biol, 2007. **8**(7): p. R132.
171. Cypser, J.R. and T.E. Johnson, *Hormesis in Caenorhabditis elegans dauer-defective mutants*. Biogerontology, 2003. **4**(4): p. 203-14.
172. Houthoofd, K., et al., *Dietary restriction in the nematode Caenorhabditis elegans*. Interdiscip Top Gerontol, 2007. **35**: p. 98-114.
173. Schulz, T.J., et al., *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress*. Cell Metab, 2007. **6**(4): p. 280-93.
174. Collins, J.J., K. Evason, and K. Kornfeld, *Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 1032-9.
175. Harrington, L.A. and C.B. Harley, *Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 1988. **43**(1): p. 71-8.
176. Adachi, H. and N. Ishii, *Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2000. **55**(6): p. B280-5.
177. Ishii, N., et al., *Coenzyme Q10 can prolong C. elegans lifespan by lowering oxidative stress*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(1): p. 41-6.
178. Larsen, P.L. and C.F. Clarke, *Extension of life-span in Caenorhabditis elegans by a diet lacking coenzyme Q*. Science, 2002. **295**(5552): p. 120-3.
179. Asencio, C., et al., *Silencing of ubiquinone biosynthesis genes extends life span in Caenorhabditis elegans*. Faseb J, 2003. **17**(9): p. 1135-7.
180. Guarente, L., *Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 923-8.
181. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
182. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
183. Bauer, J.H., et al., *An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12980-5.
184. Bass, T.M., et al., *Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(10): p. 546-52.
185. Dasgupta, B. and J. Milbrandt, *Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7217-22.
186. Doctrow, S.R., et al., *Salen-manganese complexes as catalytic scavengers of hydrogen peroxide and cytoprotective agents: structure-activity relationship studies*. J Med Chem, 2002. **45**(20): p. 4549-58.
187. Melov, S., et al., *Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8348-53.
188. Melov, S., et al., *Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1567-9.
189. Sampayo, J.N., A. Olsen, and G.J. Lithgow, *Oxidative stress in Caenorhabditis elegans: protective effects of superoxide dismutase/catalase mimetics*. Aging Cell, 2003. **2**(6): p. 319-26.

190. Keaney, M. and D. Gems, *No increase in lifespan in Caenorhabditis elegans upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(2): p. 277-82.
191. Keaney, M., et al., *Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode Caenorhabditis elegans*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(2): p. 239-50.
192. Joseph, J.A., et al., *Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation*. J Neurosci, 1999. **19**(18): p. 8114-21.
193. Wilson, M.A., et al., *Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2006. **5**(1): p. 59-68.
194. Solomon, A., et al., *Caenorhabditis elegans OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments*. Genetics, 2004. **167**(1): p. 161-70.
195. Wu, Z., et al., *Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of Caenorhabditis elegans*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002. **48**(6): p. 725-31.
196. Strayer, A., et al., *Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in Caenorhabditis elegans is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2305-7.
197. Evason, K., et al., *Anticonvulsant medications extend worm life-span*. Science, 2005. **307**(5707): p. 258-62.
198. Kornfeld, K. and K. Evason, *Effects of anticonvulsant drugs on life span*. Arch Neurol, 2006. **63**(4): p. 491-6.
199. Petrascheck, M., X. Ye, and L.B. Buck, *An antidepressant that extends lifespan in adult Caenorhabditis elegans*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 553-6.
200. Roeder, T., *Octopamine in invertebrates*. Prog Neurobiol, 1999. **59**(5): p. 533-61.
201. Niacaris, T. and L. Avery, *Serotonin regulates repolarization of the C. elegans pharyngeal muscle*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 2): p. 223-31.
202. Horvitz, H.R., et al., *Serotonin and octopamine in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1982. **216**(4549): p. 1012-4.
203. Suo, S., Y. Kimura, and H.H. Van Tol, *Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-Gq signaling in Caenorhabditis elegans*. J Neurosci, 2006. **26**(40): p. 10082-90.
204. Harris, B. and M. Harper, *Unusual appetites in patients on mianserin*. Lancet, 1980. **1**(8168 Pt 1): p. 590.
205. Kimble, J. and D. Hirsh, *The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1979. **70**(2): p. 396-417.
206. Arantes-Oliveira, N., et al., *Regulation of life-span by germ-line stem cells in Caenorhabditis elegans*. Science, 2002. **295**(5554): p. 502-5.
207. Gerisch, B., et al., *A hormonal signaling pathway influencing C. elegans metabolism, reproductive development, and life span*. Dev Cell, 2001. **1**(6): p. 841-51.
208. Berman, J.R. and C. Kenyon, *Germ-cell loss extends C. elegans life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling*. Cell, 2006. **124**(5): p. 1055-68.
209. Mukhopadhyay, A. and H.A. Tissenbaum, *Reproduction and longevity: secrets revealed by C. elegans*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(2): p. 65-71.
210. Yamawaki, T.M., et al., *Distinct activities of the germline and somatic reproductive tissues in the regulation of Caenorhabditis elegans' longevity*. Genetics, 2008. **178**(1): p. 513-26.
211. Rea, S. and T.E. Johnson, *A metabolic model for life span determination in Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 2003. **5**(2): p. 197-203.

212. Rea, S.L., N. Ventura, and T.E. Johnson, *Relationship Between Mitochondrial Electron Transport Chain Dysfunction, Development, and Life Extension in Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol, 2007. **5**(10): p. e259.
213. Rea, S.L., *Metabolism in the Caenorhabditis elegans Mit mutants*. Exp Gerontol, 2005. **40**(11): p. 841-9.
214. Rodriguez-Aguilera, J.C., et al., *The role of ubiquinone in Caenorhabditis elegans longevity*. Ageing Res Rev, 2005. **4**(1): p. 41-53.
215. Braeckman, B.P., et al., *No reduction of energy metabolism in Clk mutants*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(11): p. 1447-56.
216. Ewbank, J.J., et al., *Structural and functional conservation of the Caenorhabditis elegans timing gene clk-1*. Science, 1997. **275**(5302): p. 980-3.
217. Jonassen, T., P.L. Larsen, and C.F. Clarke, *A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived Caenorhabditis elegans clk-1 mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 421-6.
218. Aguilaniu, H., J. Durieux, and A. Dillin, *Metabolism, ubiquinone synthesis, and longevity*. Genes Dev, 2005. **19**(20): p. 2399-406.
219. Burgess, J., et al., *Molecular mechanism of maternal rescue in the clk-1 mutants of Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49555-62.
220. Lee, S.S., et al., *A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 40-8.
221. Sedensky, M.M. and P.G. Morgan, *Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in C. elegans*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 957-67.
222. Murakami, S. and T.E. Johnson, *Life extension and stress resistance in Caenorhabditis elegans modulated by the tkr-1 gene*. Curr Biol, 1998. **8**(19): p. 1091-4.
223. Murakami, S. and T.E. Johnson, *The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1517-23.
224. Johnson, T.E., et al., *Longevity genes in the nematode Caenorhabditis elegans also mediate increased resistance to stress and prevent disease*. J Inherit Metab Dis, 2002. **25**(3): p. 197-206.
225. Ward, W.F., *The relentless effects of the aging process on protein turnover*. Biogerontology, 2000. **1**(3): p. 195-9.
226. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
227. Keiper, B.D., et al., *Functional characterization of five eIF4E isoforms in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10590-6.
228. Syntichaki, P., K. Troulinaki, and N. Tavernarakis, *eIF4E function in somatic cells modulates ageing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 922-6.
229. Rattan, S.I., *Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging*. Exp Gerontol, 1996. **31**(1-2): p. 33-47.
230. Tavernarakis, N. and M. Driscoll, *Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover?* Mech Ageing Dev, 2002. **123**(2-3): p. 215-29.
231. Kirkwood, T.B. and S.N. Austad, *Why do we age?* Nature, 2000. **408**(6809): p. 233-8.
232. Wang, X., et al., *Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase*. EMBO J, 2001. **20**(16): p. 4370-9.
233. Ruvinsky, I. and O. Meyuhas, *Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(6): p. 342-8.
234. Hamilton, B., et al., *A systematic RNAi screen for longevity genes in C. elegans*. Genes Dev, 2005. **19**(13): p. 1544-55.

235. Gems, D., S. Pletcher, and L. Partridge, *Interpreting interactions between treatments that slow aging*. *Aging Cell*, 2002. **1**(1): p. 1-9.
236. Kenyon, C., *The plasticity of aging: insights from long-lived mutants*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 449-60.
237. Braeckman, B.P. and J.R. Vanfleteren, *Genetic control of longevity in C. elegans*. *Exp Gerontol*, 2007. **42**(1-2): p. 90-8.
238. Braeckman, B.P. and J.R. Vanfleteren, *Genetic control of longevity in C. elegans*. *Exp Gerontol*, 2006.
239. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
240. Friedman, D.B. and T.E. Johnson, *A mutation in the age-1 gene in Caenorhabditis elegans lengthens life and reduces hermaphrodite fertility*. *Genetics*, 1988. **118**(1): p. 75-86.
241. Morris, J.Z., H.A. Tissenbaum, and G. Ruvkun, *A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1996. **382**(6591): p. 536-9.
242. Lin, K., et al., *daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1319-22.
243. Pierce, S.B., et al., *Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse C. elegans insulin gene family*. *Genes Dev*, 2001. **15**(6): p. 672-86.
244. Li, W., S.G. Kennedy, and G. Ruvkun, *daf-28 encodes a C. elegans insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway*. *Genes Dev*, 2003. **17**(7): p. 844-58.
245. Wolkow, C.A., et al., *Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the Caenorhabditis elegans daf-2/insulin-like signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49591-7.
246. Ogg, S. and G. Ruvkun, *The C. elegans PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway*. *Mol Cell*, 1998. **2**(6): p. 887-93.
247. Paradis, S., et al., *A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 1999. **13**(11): p. 1438-52.
248. Paradis, S. and G. Ruvkun, *Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor*. *Genes Dev*, 1998. **12**(16): p. 2488-98.
249. Hertweck, M., C. Gobel, and R. Baumeister, *C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span*. *Dev Cell*, 2004. **6**(4): p. 577-88.
250. Ogg, S., et al., *The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans*. *Nature*, 1997. **389**(6654): p. 994-9.
251. Lee, R.Y., J. Hench, and G. Ruvkun, *Regulation of C. elegans DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway*. *Curr Biol*, 2001. **11**(24): p. 1950-7.
252. Avery, L. and S. Wasserman, *Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies*. *Trends Genet*, 1992. **8**(9): p. 312-6.
253. Huang, L.S. and P.W. Sternberg, *Genetic dissection of developmental pathways*. *Methods Cell Biol*, 1995. **48**: p. 97-122.
254. Vowels, J.J. and J.H. Thomas, *Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1992. **130**(1): p. 105-23.
255. Gems, D., et al., *Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1998. **150**(1): p. 129-55.

256. Patel, D.S., et al., *Clustering of genetically defined allele classes in the *Caenorhabditis elegans* DAF-2 insulin/IGF-1 receptor*. *Genetics*, 2008. **178**(2): p. 931-46.
257. Kim, H., et al., *Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformational polymorphisms*. *Diabetologia*, 1992. **35**(3): p. 261-6.
258. Moller, D.E., et al., *Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance*. *Diabetes*, 1994. **43**(2): p. 247-55.
259. Krook, A., et al., *Molecular scanning of the insulin receptor gene in syndromes of insulin resistance*. *Diabetes*, 1994. **43**(3): p. 357-68.
260. Garza-Garcia, A., et al., *RILM: a web-based resource to aid comparative and functional analysis of the insulin and IGF-1 receptor family*. *Hum Mutat*, 2007. **28**(7): p. 660-8.
261. Krook, A., et al., *Two naturally occurring mutant insulin receptors phosphorylate insulin receptor substrate-1 (IRS-1) but fail to mediate the biological effects of insulin. Evidence that IRS-1 phosphorylation is not sufficient for normal insulin action*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(12): p. 7134-40.
262. Hamer, I., et al., *An arginine to cysteine(252) mutation in insulin receptors from a patient with severe insulin resistance inhibits receptor internalisation but preserves signalling events*. *Diabetologia*, 2002. **45**(5): p. 657-67.
263. Lin, S.J., et al., *Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration*. *Nature*, 2002. **418**(6895): p. 344-8.
264. Krook, A., et al., *Two naturally occurring insulin receptor tyrosine kinase domain mutants provide evidence that phosphoinositide 3-kinase activation alone is not sufficient for the mediation of insulin's metabolic and mitogenic effects*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(48): p. 30208-14.
265. Nanji, M., N.A. Hopper, and D. Gems, *LET-60 RAS modulates effects of insulin/IGF-1 signaling on development and aging in *Caenorhabditis elegans**. *Aging Cell*, 2005. **4**(5): p. 235-45.
266. Borland, C.Z., J.L. Schutzman, and M.J. Stern, *Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans**. *Bioessays*, 2001. **23**(12): p. 1120-30.
267. Hirotsu, T., et al., *The Ras-MAPK pathway is important for olfaction in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 289-93.
268. Sternberg, P.W. and M. Han, *Genetics of RAS signaling in *C. elegans**. *Trends Genet*, 1998. **14**(11): p. 466-72.
269. Friedman, D.B. and T.E. Johnson, *Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene*. *J Gerontol*, 1988. **43**(4): p. B102-9.
270. Hertweck, M., **C. elegans* gives the dirt on aging*. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2005. **2005**(41): p. pe31.
271. Dorman, J.B., et al., *The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans**. *Genetics*, 1995. **141**(4): p. 1399-406.
272. Honda, Y. and S. Honda, *The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans**. *Faseb J*, 1999. **13**(11): p. 1385-93.
273. Yanase, S. and N. Ishi, *Cloning of the oxidative stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans**. *J Radiat Res (Tokyo)*, 1999. **40**(1): p. 39-47.
274. Walker, G.A., et al., *Heat shock protein accumulation is upregulated in a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans**. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001. **56**(7): p. B281-7.

275. Henderson, S.T. and T.E. Johnson, *daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2001. **11**(24): p. 1975-80.
276. Lin, K., et al., *Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling*. *Nat Genet*, 2001. **28**(2): p. 139-45.
277. Lee, S.S., et al., *DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 644-7.
278. Oh, S.W., et al., *Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation*. *Nat Genet*, 2006. **38**(2): p. 251-7.
279. Murphy, C.T., et al., *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
280. Murphy, C.T., *The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: Approaches and discoveries*. *Exp Gerontol*, 2006.
281. Mukhopadhyay, A., S.W. Oh, and H.A. Tissenbaum, *Worming pathways to and from DAF-16/FOXO*. *Exp Gerontol*, 2006.
282. McElwee, J., K. Bubb, and J.H. Thomas, *Transcriptional outputs of the Caenorhabditis elegans forkhead protein DAF-16*. *Aging Cell*, 2003. **2**(2): p. 111-21.
283. Yu, H. and P.L. Larsen, *DAF-16-dependent and independent expression targets of DAF-2 insulin receptor-like pathway in Caenorhabditis elegans include FKBP*s. *J Mol Biol*, 2001. **314**(5): p. 1017-28.
284. Larsen, P.L., *Direct and indirect transcriptional targets of DAF-16*. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2003. **2003**(17): p. PE9.
285. Jensen, V.L., M. Gallo, and D.L. Riddle, *Targets of DAF-16 involved in Caenorhabditis elegans adult longevity and dauer formation*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(10): p. 922-7.
286. Pinkston-Gosse, J. and C. Kenyon, *DAF-16/FOXO targets genes that regulate tumor growth in Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 2007. **39**(11): p. 1403-9.
287. Oh, S.W., et al., *JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(12): p. 4494-9.
288. Lehtinen, M.K., et al., *A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 987-1001.
289. Antebi, A., *Genetics of aging in Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(9): p. 1565-71.
290. Li, W., et al., *RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates C. elegans aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination*. *Dev Cell*, 2007. **12**(2): p. 235-46.
291. Wolff, S. and A. Dillin, *The trifecta of aging in Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(10): p. 894-903.
292. Hajdu-Cronin, Y.M., W.J. Chen, and P.W. Sternberg, *The L-type cyclin CYL-1 and the heat-shock-factor HSF-1 are required for heat-shock-induced protein expression in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2004. **168**(4): p. 1937-49.
293. Morley, J.F. and R.I. Morimoto, *Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(2): p. 657-64.
294. Garigan, D., et al., *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation*. *Genetics*, 2002. **161**(3): p. 1101-12.
295. Berdichevsky, A., et al., *C. elegans SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span*. *Cell*, 2006. **125**(6): p. 1165-77.
296. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
297. Essers, M.A., et al., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. *Science*, 2005. **308**(5725): p. 1181-4.

298. Inoue, H., et al., *The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response*. Genes Dev, 2005. **19**(19): p. 2278-83.
299. Benzing, T., et al., *Interaction of 14-3-3 protein with regulator of G protein signaling 7 is dynamically regulated by tumor necrosis factor- α* . J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32954-62.
300. Jones, S.J., et al., *Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in Caenorhabditis elegans*. Genome Res, 2001. **11**(8): p. 1346-52.
301. Yanase, S., K. Yasuda, and N. Ishii, *Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of Caenorhabditis elegans (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(12): p. 1579-87.
302. Ookuma, S., M. Fukuda, and E. Nishida, *Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, scl-1, that regulates longevity and stress resistance in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2003. **13**(5): p. 427-31.
303. Dillin, A., D.K. Crawford, and C. Kenyon, *Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in C. elegans*. Science, 2002. **298**(5594): p. 830-4.
304. Apfeld, J. and C. Kenyon, *Cell nonautonomy of C. elegans daf-2 function in the regulation of diapause and life span*. Cell, 1998. **95**(2): p. 199-210.
305. Libina, N., J.R. Berman, and C. Kenyon, *Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan*. Cell, 2003. **115**(4): p. 489-502.
306. Wolkow, C.A., et al., *Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system*. Science, 2000. **290**(5489): p. 147-50.
307. Hosono, R., et al., *Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 1980. **15**(4): p. 285-9.
308. Gompertz, B., *On the nature and the function of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies* Phil. Trans. R. Soc. Lond, 1925. **115**: p. 513-585.
309. Shoyama, T., et al., *Basic principle of the lifespan in the nematode C. elegans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(9): p. 529-37.
310. Strehler, B.L. and A.S. Mildvan, *General theory of mortality and aging*. Science, 1960. **132**: p. 14-21.
311. Sacher, G.A. and E. Trucco, *The stochastic theory of mortality*. Ann N Y Acad Sci, 1962. **96**: p. 985-1007.
312. Yashin, A.I., K.G. Manton, and J.W. Vaupel, *Mortality and aging in a heterogeneous population: a stochastic process model with observed and unobserved variables*. Theor Popul Biol, 1985. **27**(2): p. 154-75.
313. Huang, C., C. Xiong, and K. Kornfeld, *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8084-9.
314. Gerstbrein, B., et al., *In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2005. **4**(3): p. 127-37.
315. Golden, T.R., et al., *Dramatic age-related changes in nuclear and genome copy number in the nematode Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(2): p. 179-88.
316. Hill, A.A., et al., *Genomic analysis of gene expression in C. elegans*. Science, 2000. **290**(5492): p. 809-12.
317. Lund, J., et al., *Transcriptional profile of aging in C. elegans*. Curr Biol, 2002. **12**(18): p. 1566-73.
318. Golden, T.R. and S. Melov, *Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes*. Aging Cell, 2004. **3**(3): p. 111-24.
319. Melov, S., *Spotlight on nematode mitochondria in RNAi mega-screen*. Sci Aging Knowledge Environ, 2002. **2002**(47): p. pe18.

320. Golden, T.R., A. Hubbard, and S. Melov, *Microarray analysis of variation in individual aging C. elegans: approaches and challenges*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 1040-5.
321. Melov, S., et al., *Detection of deletions in the mitochondrial genome of Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 1075-8.
322. Melov, S., et al., *Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(8): p. 1419-25.
323. Passos, J.F., et al., *Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence*. PLoS Biol, 2007. **5**(5): p. e110.
324. Houthoofd, K., et al., *Extending life-span in C. elegans*. Science, 2004. **305**(5688): p. 1238-9.
325. Moore, B.W., McGregor, D., *Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver*. J Biol Chem, 1965. **240**: p. 1647-53.
326. Moore, B.E., Perez, V. J. , *Physiological and biochemical aspects of nervous integration.*, ed. C.F. D. 1967: Englewood Cliffs. 343-59.
327. Liao, J. and M.B. Omary, *14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor*. J Cell Biol, 1996. **133**(2): p. 345-57.
328. Zhang, L., J. Chen, and H. Fu, *Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8511-5.
329. Rosenquist, M., et al., *Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?* J Mol Evol, 2000. **51**(5): p. 446-58.
330. Jones, D.H., S. Ley, and A. Aitken, *Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 55-8.
331. Chaudhri, M., M. Scarabel, and A. Aitken, *Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(3): p. 679-85.
332. Xiao, B., et al., *Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 188-91.
333. Gardino, A.K., S.J. Smerdon, and M.B. Yaffe, *Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(3): p. 173-82.
334. Wilker, E.W., et al., *A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18891-8.
335. Darling, D.L., J. Yingling, and A. Wynshaw-Boris, *Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development*. Curr Top Dev Biol, 2005. **68**: p. 281-315.
336. van Heusden, G.P., et al., *The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast Saccharomyces cerevisiae and can be replaced by a plant homologue*. Eur J Biochem, 1995. **229**(1): p. 45-53.
337. Muslin, A.J., et al., *Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine*. Cell, 1996. **84**(6): p. 889-97.
338. Yaffe, M.B., et al., *The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity*. Cell, 1997. **91**(7): p. 961-71.
339. Aitken, A., *Protein consensus sequence motifs*. Mol Biotechnol, 1999. **12**: p. 241-53.
340. Mackintosh, C., *Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 2): p. 329-42.

341. Petosa, C., Masters, SC., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., et al., *14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove*. J Biol Chem, 1998(273): p. 16305-10.
342. Waterman, M.J., et al., *ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 175-8.
343. Muslin, A.J. and H. Xing, *14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference*. Cell Signal, 2000. **12**(11-12): p. 703-9.
344. Henriksson, M.L., et al., *A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo*. Eur J Biochem, 2002. **269**(20): p. 4921-9.
345. Tzivion, G., Y.H. Shen, and J. Zhu, *14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6331-8.
346. Bridges, D. and G.B. Moorhead, *14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein*. Sci STKE, 2005. **2005**(296): p. re10.
347. Liu, Y., et al., *Laminar flow inhibits TNF-induced ASK1 activation by preventing dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 917-23.
348. Kosaki, A., et al., *14-3-3beta protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 940-4.
349. Van Der Hoeven, P.C., et al., *Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3*. Biochem J, 2000. **347 Pt 3**: p. 781-5.
350. Weiner, H. and W.M. Kaiser, *Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins*. J Exp Bot, 2001. **52**(359): p. 1165-72.
351. Lopez-Girona, A., et al., *Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 172-5.
352. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25*. Genes Dev, 1999. **13**(9): p. 1067-72.
353. Dunaway, S., H.Y. Liu, and N.C. Walworth, *Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 39-50.
354. Cahill, C.M., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 13402-10.
355. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
356. Pozuelo Rubio, M., et al., *14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 395-408.
357. Jin, J., et al., *Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. 1436-50.
358. Meek, S.E., W.S. Lane, and H. Piwnicka-Worms, *Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32046-54.
359. Benzinger, A., et al., *Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(6): p. 785-95.
360. Fu, H., R.R. Subramanian, and S.C. Masters, *14-3-3 proteins: structure, function, and regulation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 617-47.
361. van Hemert, M.J., H.Y. Steensma, and G.P. van Heusden, *14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis*. Bioessays, 2001. **23**(10): p. 936-46.

362. Aitken, A., *14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(9): p. 341-7.
363. Aitken, A., *14-3-3 proteins: a historic overview*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(3): p. 162-72.
364. Aitken, A., *Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants*. Plant Mol Biol, 2002. **50**(6): p. 993-1010.
365. Aitken, A., et al., *Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C*. Mol Cell Biochem, 1995. **149-150**: p. 41-9.
366. Dubois, T., et al., *14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 28882-8.
367. Olivari, C., et al., *Phenylarsine oxide inhibits the fusicoccin-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase*. Plant Physiol, 2000. **122**(2): p. 463-70.
368. Woodcock, J.M., et al., *The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36323-7.
369. Tsuruta, F., et al., *JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins*. Embo J, 2004. **23**(8): p. 1889-99.
370. Powell, D.W., et al., *Proteomic identification of 14-3-3zeta as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5376-87.
371. Ku, N.O., J. Liao, and M.B. Omary, *Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins*. Embo J, 1998. **17**(7): p. 1892-906.
372. Tzivion, G., Z.J. Luo, and J. Avruch, *Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29772-8.
373. Mackie, S. and A. Aitken, *Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease*. Febs J, 2005. **272**(16): p. 4202-10.
374. Wilker, E. and M.B. Yaffe, *14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(3): p. 633-42.
375. Hermeking, H., *14-3-3 proteins and cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(3): p. 161.
376. Tzivion, G., et al., *14-3-3 proteins as potential oncogenes*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(3): p. 203-13.
377. Dougherty, M.K. and D.K. Morrison, *Unlocking the code of 14-3-3*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 10): p. 1875-84.
378. Hermeking, H., *The 14-3-3 cancer connection*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(12): p. 931-43.
379. Wang, W. and D.C. Shakes, *Isolation and sequence analysis of a Caenorhabditis elegans cDNA which encodes a 14-3-3 homologue*. Gene, 1994. **147**(2): p. 215-8.
380. Wang, W. and D.C. Shakes, *Expression patterns and transcript processing of fit-1 and fit-2, two C. elegans 14-3-3 homologues*. J Mol Biol, 1997. **268**(3): p. 619-30.
381. Cheeks, R.J., et al., *C. elegans PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes*. Curr Biol, 2004. **14**(10): p. 851-62.
382. Nance, J., *PAR proteins and the establishment of cell polarity during C. elegans development*. Bioessays, 2005. **27**(2): p. 126-35.
383. Morton, D.G., et al., *The Caenorhabditis elegans par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo*. Dev Biol, 2002. **241**(1): p. 47-58.
384. Wang, Y., et al., *C. elegans 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(9): p. 741-7.

385. Li, J., et al., *The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 2007. **301**(1): p. 82-91.
386. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39360-7.
387. Van Der Heide, L.P., M.F. Hoekman, and M.P. Smidt, *The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 297-309.
388. Obsil, T., et al., *Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding*. Biochemistry, 2003. **42**(51): p. 15264-72.
389. Obsilova, V., et al., *14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4*. Biochemistry, 2005. **44**(34): p. 11608-17.
390. Sato, M., et al., *14-3-3 protein interferes with the binding of RNA to the phosphorylated form of fission yeast meiotic regulator Mei2p*. Curr Biol, 2002. **12**(2): p. 141-5.
391. Craparo, A., R. Freund, and T.A. Gustafson, *14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11663-9.
392. Bonnefoy-Berard, N., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10142-6.
393. Lehner, B., et al., *Systematic mapping of genetic interactions in Caenorhabditis elegans identifies common modifiers of diverse signaling pathways*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 896-903.
394. Byrne, A.B., et al., *A global analysis of genetic interactions in Caenorhabditis elegans*. J Biol, 2007. **6**(3): p. 8.
395. Kamath, R.S., et al., *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Genome Biol, 2001. **2**(1): p. RESEARCH0002.
396. Sijen, T., et al., *On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing*. Cell, 2001. **107**(4): p. 465-76.
397. Simmer, F., et al., *Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes C. elegans hypersensitive to RNAi*. Curr Biol, 2002. **12**(15): p. 1317-9.
398. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
399. Carroll, K., C. Gomez, and L. Shapiro, *Tubby proteins: the plot thickens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 55-63.
400. Mukhopadhyay, A., et al., *C. elegans tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 35-42.
401. Mukhopadhyay, A., et al., *An endocytic pathway as a target of tubby for regulation of fat storage*. EMBO Rep, 2007. **8**(10): p. 974.
402. Roubin, R., et al., *let-756, a C. elegans fgf essential for worm development*. Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6741-7.
403. Popovici, C., et al., *Direct and heterologous approaches to identify the LET-756/FGF interactome*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 105.
404. Wong, A., P. Boutis, and S. Hekimi, *Mutations in the clk-1 gene of Caenorhabditis elegans affect developmental and behavioral timing*. Genetics, 1995. **139**(3): p. 1247-59.
405. Stein, L.D., et al., *The genome sequence of Caenorhabditis briggsae: a platform for comparative genomics*. PLoS Biol, 2003. **1**(2): p. E45.

406. Kiontke, K., et al., *Caenorhabditis phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9003-8.
407. Nayak, S., J. Goree, and T. Schedl, *fog-2 and the evolution of self-fertile hermaphroditism in Caenorhabditis*. PLoS Biol, 2005. **3**(1): p. e6.
408. McCulloch, D. and D. Gems, *Evolution of male longevity bias in nematodes*. Aging Cell, 2003. **2**(3): p. 165-73.
409. Fodor, A., et al., *Comparison of a new wild-type Caenorhabditis briggsae with laboratory strains of C. briggsae and C. elegans*. Nematologica, 1983. **29**: p. 203-2017.
410. Hillier, L.W., et al., *Comparison of C. elegans and C. briggsae Genome Sequences Reveals Extensive Conservation of Chromosome Organization and Synteny*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e167.
411. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
412. Ailion, M. and J.H. Thomas, *Isolation and characterization of high-temperature-induced Dauer formation mutants in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2003. **165**(1): p. 127-44.
413. Inoue, T., et al., *Genetic analysis of dauer formation in Caenorhabditis briggsae*. Genetics, 2007. **177**(2): p. 809-18.
414. Barro, M., et al., *Myoblasts from affected and non affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects*. J Cell Mol Med, 2008.
415. Laoudj-Chenivesse, D., et al., *Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle*. J Mol Med, 2005. **83**(3): p. 216-24.
416. Tupler, R. and D. Gabellini, *Molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(5): p. 557-66.
417. Roy, P.J., et al., *Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 975-9.
418. Yang, W., J. Li, and S. Hekimi, *A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2007. **177**(4): p. 2063-74.
419. Fujii, M., et al., *Uncoupling of longevity and paraquat resistance in mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005. **69**(10): p. 2015-8.
420. Porter, M.Y., M. Turmaine, and S.E. Mole, *Identification and characterization of Caenorhabditis elegans palmitoyl protein thioesterase I*. J Neurosci Res, 2005. **79**(6): p. 836-48.
421. Farina, F., et al., *Differential expression pattern of the four mitochondrial adenine nucleotide transporter ant genes and their roles during the development of Caenorhabditis elegans*. Dev Dyn, 2008. **237**(6): p. 1668-81.
422. Sulston, J.E., *C. elegans: the cell lineage and beyond*. Biosci Rep, 2003. **23**(2-3): p. 49-66.
423. Feng, J., F. Bussiere, and S. Hekimi, *Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 633-44.

RESUME

Rôle des protéines 14-3-3 dans la régulation de la longévité par la voie DAF-2/Insuline/IGF-1 chez *Caenorhabditis elegans*.

Les protéines 14-3-3 sont des protéines ubiquitaires conservées chez tous les eucaryotes. Elles interagissent avec de multiples partenaires, dont elles modulent la fonction et la localisation, et interviennent de ce fait dans de nombreux processus cellulaires. FTT-1 et FTT-2 sont les deux orthologues de 14-3-3 présents chez *Caenorhabditis elegans*. En utilisant l'approche de RNA interférence, nous avons montré que les protéines FTT sont impliquées dans la voie DAF-2/Insuline/IGF-1, régissant la longévité, la résistance au stress et le métabolisme chez *C. elegans*, et dont l'effecteur majeur est le facteur de transcription DAF-16, orthologue de Forkhead chez les mammifères. Ce travail de thèse a permis de caractériser les fonctions de chacune des protéines FTT dans la régulation des différents phénotypes engendrés par cette voie et de mettre en évidence le rôle prépondérant de FTT-2. D'autre part, nos données ont révélé la contribution supplémentaire de FTT-2 dans la régulation de la longévité et du métabolisme lipidique et de FTT-1 et FTT-2 dans la résistance au stress, à travers un mécanisme parallèle à la voie DAF-2/Ins/IGF-1 et ne mettant pas en jeu DAF-16. Les résultats de notre étude soulignent la complexité des fonctions des protéines FTT et démontrent leur participation à plusieurs processus importants pour la survie de *C. elegans* lors d'une exposition à un stress mais aussi lors du vieillissement physiologique du nématode.

SUMMARY

Role of 14-3-3 proteins in lifespan regulation by the DAF-2/Insulin/IGF-1 pathway in *C. elegans*

14-3-3 proteins are ubiquitous proteins highly conserved among eukaryotes. They are involved in the regulation of several cellular processes by modifying the function and the localization of many targeted proteins. FTT-1 and FTT-2 are the two 14-3-3 orthologs identified in *C. elegans*. We showed that FTT proteins are involved in the main longevity pathway of *C. elegans*: the DAF-2/Insulin/IGF-1-like pathway which also regulates stress resistance and metabolism through the activity of its final effector DAF-16, the ortholog of the Forkhead transcription factor in mammals. This PhD work allowed us to determine the specific functions of each FTT protein in the different phenotypes conferred by this pathway and to highlight the prominent role of FTT-2. Moreover, our data revealed the additional implication of FTT-2 in the regulation of lifespan and lipid metabolism, and the contribution of both FTT proteins in stress resistance, by a mechanism distinct from the DAF-2/Insulin/IGF-1-like pathway and independent of DAF-16. Taking together, our results enhance the complexity of FTT functions and demonstrate their involvement in several processes essential for worms survival, not only under stress conditions, but also during normal aging.

DISCIPLINE

Biologie moléculaire et cellulaire.

MOTS-CLES

Caenorhabditis elegans, protéines 14-3-3/FTT-1/FTT-2, voie DAF-2/Insuline/IGF-1, DAF-16/Forkhead, longévité, résistance au stress, RNA interférence.

LABORATOIRE

Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire (CRBM), CNRS
1919 route de Mende
34293 Montpellier, cedex 5