



**HAL**  
open science

# Caractérisation fonctionnelle de jouvence, un petit ARN nucléolaire requis dans l'épithélium de l'intestin chez la drosophile

Stéphanie Soulé

## ► To cite this version:

Stéphanie Soulé. Caractérisation fonctionnelle de jouvence, un petit ARN nucléolaire requis dans l'épithélium de l'intestin chez la drosophile. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL054 . tel-03475589

**HAL Id: tel-03475589**

**<https://theses.hal.science/tel-03475589v1>**

Submitted on 11 Dec 2021

**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.

# Caractérisation fonctionnelle de *jouvence*, un petit ARN nucléolaire requis dans l'épithélium de l'intestin chez la drosophile

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568, Signalisations et Réseaux Intégratifs en  
Biologie (BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences de  
Paris-Saclay (NeuroPSI), 91190, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté de Médecine

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 10  
décembre 2020, par

**Stéphanie Carita SOULE**

### Composition du Jury

**Jacques MONTAGNE**

DR, Université Paris-Saclay/CNRS (I2BC)

Président/Examineur

**Bertrand MOLLEREAU**

Professeur, ENS de Lyon (LBMC)

Rapporteur & Examineur

**Jean-Yves ROIGNANT**

Professeur associé, Université de Lausanne (CIG)

Rapporteur & Examineur

**Pierre LEOPOLD**

DR, Université Pierre et Marie Curie/Institut Curie

Examineur

**Jean-René MARTIN**

DR, Université Paris-Saclay/CNRS (NeuroPSI)

Directeur de thèse

**Titre :** Caractérisation fonctionnelle de *jouvence*, un petit ARN nucléolaire requis dans l'épithélium de l'intestin chez la drosophile.

**Mots clés :** Petit ARN nucléolaire (snoARN), vieillissement, longévité, intestin, métabolisme des lipides.

**Résumé :** Le vieillissement massif de la population et le bond incroyable ces dernières décennies de l'espérance de vie ont entraîné une prise de conscience de l'importance de ce problème. La nécessité de mieux appréhender les mécanismes du vieillissement est devenue une urgence de santé publique. De nombreux groupes de recherche se consacrent depuis quelques années à l'identification de gènes et de voies de signalisation impliqués dans le processus du vieillissement. Ce processus biologique, qui touche chaque espèce et chaque individu de manière spécifique, se caractérise par un déclin graduel de la fonction de nombreux processus physiologiques en fonction de l'âge. Toutefois même s'il est inéluctable, le vieillissement est influençable. En effet, de nombreux facteurs, autant intrinsèques (facteurs génétiques, téloméras, stress oxydatif), qu'extrinsèques (hygiène de vie, pollution, alimentation) vont influencer le vieillissement. C'est d'ailleurs un facteur de risque important dans le développement de nombreuses pathologies associées à l'âge (le diabète de type II, le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires). De plus, il a déjà été démontré dans la littérature que la modulation d'un seul gène peut influencer, autant positivement que négativement, le vieillissement d'un individu. Plus que l'allongement de la durée de vie, c'est une durée de vie sans déficience (concept du « bien vieillir ») qui fait l'objet des principales recherches. Les gènes ayant des

effets sur ce processus sont habituellement des gènes jouant un rôle important dans une voie de signalisation et donc, sont souvent conservés à travers l'évolution. Les travaux décrits dans cette thèse concernent l'implication d'un nouveau snoARN (*jouvence*), requis dans l'épithélium de l'intestin, dans les mécanismes du vieillissement de la drosophile. Ils ont en particulier révélé la capacité de ce snoARN à augmenter de manière spectaculaire la durée de vie des mouches en enrayant les mécanismes du vieillissement et en luttant contre les effets délétères associés. *jouvence* permettrait ainsi de lutter contre les maladies associées à la vieillesse telles que la neurodégénérescence, l'hyperplasie intestinale, mais également contre les troubles métaboliques, tout en prolongeant la durée de vie de l'organisme. Il serait impliqué dans différentes voies métaboliques pouvant avoir un impact sur la santé à long terme des drosophiles. *jouvence* semble réguler le métabolisme lipidique, l'homéostasie intestinale, ainsi que la résistance au stress. Par contre, son inactivation provoque des effets néfastes qui mènent à la dégradation rapide de plusieurs fonctions métaboliques et à la mort prématurée des mouches. Les résultats obtenus dans cette étude dévoilent un lien entre *jouvence* et le contrôle du vieillissement en santé chez la drosophile.

**Title :** Functional characterization of *jouvence*, a small nucleolar RNA required in the intestinal epithelium of *Drosophila*.

**Keywords :** small nucleolar RNA (snoARN), aging, longevity, gut, lipid metabolism.

**Abstract :** The massive ageing of the population and the incredible leap in life expectancy in recent decades have led to an awareness of the importance of this problem. The need to better understand the mechanisms of ageing has become a public health emergency. Many research groups have been working for several years to identify genes and signalling pathways involved in the aging process. This biological process, which affects each species and each individual independently, is characterized by a gradual decline of function of many physiological processes as a function of age. However, even though it is inevitable, aging is still subject to influence. Indeed, many factors, both intrinsic (genetic factors, telomeres, oxidative stress) and environmental (lifestyle, diet, pollution) will influence aging. Aging is also an important risk factor for the development of many diseases such as type 2 diabetes, cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases. Moreover, it has already been reported in the literature that modulation of a single gene can influence, both positively and negatively, the aging process of an individual. More than the extension of life expectancy, it is a life expectancy without deficiency (concept of "aging well") that is the subject of major research. Genes with effects on this process are usually genes

that play an important role in a signalling pathway, and therefore are often conserved across evolution. The work described in this thesis shows the involvement of a new snoARN (*jouvence*), required in the intestinal epithelium, in the aging mechanisms of the fly *D. melanogaster*. In particular, they revealed the ability of this snoARN to dramatically increase the lifespan of flies by halting the mechanisms of aging and fighting against the associated deleterious effects. *jouvence* would thus make it possible to fight against diseases associated with old age such as neurodegeneration, intestinal hyperplasia, but also against metabolic disorders, while prolonging the lifespan of the organism. This snoARN appears to be involved in various metabolic pathways that may impact on long-term health of fruit flies. *jouvence* appears to regulate lipid metabolism, intestinal homeostasis, and stress resistance. On the other hand, its inactivation causes adverse effects that lead to the rapid degradation of several metabolic functions and premature death of flies. The results obtained in this study reveal a link between youthfulness and the control of healthy aging in *D. melanogaster*.

# REMERCIEMENTS

Même si les fins de grandes aventures sont généralement synonymes de tristesse, elles représentent toutefois l'opportunité de regarder en arrière le chemin parcouru et de repenser à toutes les rencontres qui ont jalonné notre parcours. Le moment est ainsi venu pour moi aujourd'hui de me prêter à cet exercice de souvenir me permettant au passage de remercier toutes ces personnes qui ont participé directement ou indirectement à cette thèse durant ces quatre années. Il est bien évident que la réalisation de ce document n'aurait pas pu avoir lieu sans l'aide précieuse de très nombreuses personnes.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mon maître de thèse, **Jean-René MARTIN**, pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant dans son équipe, en acceptant d'encadrer mon travail, et de m'avoir accompagné pendant ces années. Il y a quatre ans, vous m'avez donné l'opportunité de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche en me proposant cette thèse. C'est un défi que j'ai particulièrement apprécié et je vous en remercie. Nous avons réussi à faire avancer ensemble ce projet de thèse. C'est un accomplissement en soi.

Je souhaite également remercier tous mes collègues de travail. **L. MELLOOTTE**, ma formatrice de pailasse, pendant toutes ces années où nous avons partagé un espace de travail, tu m'as formé dès mon arrivée dans l'équipe et pour ça, je te dis mille fois merci. J'ai apprécié chaque instant passé à travailler à tes côtés. Je remercie également **F. EL-KHOURY**, arrivée dans l'équipe l'année suivante, et dont l'aide, les conseils et la bonne humeur m'ont été d'une bénédiction, ainsi qu'à nos nombreuses discussions tard le soir qui m'ont permis de m'évader quelques minutes. Je n'oublie pas non plus les stagiaires qui nous ont côtoyés pour un temps et qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre à cette thèse : en particulier **L. DUFOUR** et **M. PROST** pour les travaux qu'elles ont réalisés au cours de leur stage.

Je tiens également à adresser mes remerciements à **H. TRICOIRE** et **J-R. HYUNH** pour avoir acceptés de suivre l'avancée de mon travail tout au long de mon doctorat en faisant partie de mon comité de suivi de thèse, mais aussi de m'avoir donné des recommandations utiles. Merci aux membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'en faire partie, et de prendre le temps d'évaluer mon travail. Je remercie **J-Y. ROIGNANT** et **B. MOLLEREAU** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que **P. LEOPOLD** et **J. MONTAGNE** qui ont accepté d'examiner mon travail. Grâce à vous, je pourrai clôturer cette merveilleuse aventure.

Bien évidemment, il me faut remercier ma camarade de galère, **L. TIROU**. Tu fais partie de ma vie depuis le début de cette thèse. Tu as été ma voisine de couloir et maintenant, je suis heureuse de te compter parmi mes ami(e)s proches. Nous avons vécu cette thèse ensemble, car même si nous ne l'avons pas commencé à la même période, nous l'avons fini ensemble. Je n'aurais pas choisi mieux comme personne pour vivre cette expérience. Merci pour tes fous rires, pour ta présence et pour ton écoute. Merci pour tous ces moments que nous avons passé à parler d'autre chose que du labo, du travail ou de sciences. Merci également d'avoir partagé ces très nombreuses heures de rédaction. Nous nous sommes mutuellement encouragées. Merci également à

tous mes autres collègues et ami(e)s du NEUROPSI, entre autres, **M. RUSSO** et **G. FRIGHETTO**. Merci également à toutes les personnes, que j'ai pu côtoyer durant cette thèse, pour leur sympathie et leur gentillesse, et aussi à ceux avec qui j'ai eu un véritable plaisir d'organiser le « NeuroPSI Talents Day ».

**Stéphane** et **Nadjlah**, mes amis de toujours. Nous nous sommes connus durant notre licence et aujourd'hui je peux dire que vous êtes encore là. Même si nous ne sommes plus au même endroit et que des kilomètres nous séparent, cela n'a pas empêché notre amitié. Durant ces quatre années, j'ai pu compter sur votre soutien sans faille et vos conseils.

À mon compagnon, **David**, nous sommes venus ensemble à Paris. Rien ne me prédestinait à faire une thèse, mais tu as toujours été là pour me soutenir. Je ne compte plus le nombre de soir où tu as été là pour m'apaiser de ces longues journées. Tu as été un soutien sans faille durant cette période, surtout avec la distance qui nous sépare de nos familles. Merci d'avoir écouté mes frustrations et de m'avoir encouragé, et surtout de m'avoir supporté. Tout n'a pas été forcément rose mais tu as su être patient et présent. Je remercie également mon cercle d'amis qui m'ont fait changer les idées.

Et pour finir, un merci particulier et immense à mon **frère, Richard**, et surtout à **mes parents** pour leur présence, qui ont dû désespérer de ne plus me voir pendant ces années de thèse. Merci à mes parents pour leurs bons mots, leurs encouragements et leur amour inconditionnel. Disons-le clairement, cette thèse a été très enrichissante mais aussi très prenante. Ça n'a pas été toujours facile, mais vous avez toujours été là, peu importe l'urgence ou la non-urgence de la situation. Vous m'avez accompagné et soutenu dans cette démarche. Vous avez rendu ce travail concret et je vous en remercie. Être loin de ses proches n'est toujours pas si simple mais le fait de savoir que je peux compter sur vous m'a donné envie de me surpasser et de mener cette thèse à son terme.

# PRODUCTION SCIENTIFIQUE

## PUBLICATION

- ✓ **S. SOULE**, L. MELLOOTTEE, A. ARAB, C. CHEN & J.R. MARTIN. "*Jouvence a small nucleolar RNA required in the gut extends lifespan in Drosophila.*" **Nature Communications** ; 11, Article number : 987 (2020).

## PUBLICATION EN PREPARATION

- ✓ **S. SOULE**, L. MELLOOTTEE & J.R. MARTIN. "*ninaD regulates cholesterol homeostasis from the midgut and protects against neurodegeneration.*" **Current Biology** – In progress.

## PARTICIPATIONS AUX CONGRES NATIONAUX

- ✓ **Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI)**

Du 8 au 9 juin 2017 à Dijon (France)

Présentation orale : "*jouvence, a new snoARN expressed in the epithelium of the gut increases lifespan through the lipids absorption and metabolism in Drosophila.*"

**S. SOULE**, L. MELLOOTTEE & J.R. MARTIN.

- ✓ **Drosoph'Île-de-France (DIF-Day)**

Le 15 juin 2017 à l'Institut Pasteur à Paris (France)

Poster : "*jouvence, a new snoARN expressed in the epithelium of the gut increases lifespan through the lipids absorption and metabolism in Drosophila.*"

**S. SOULE**, L. MELLOOTTEE & J.R. MARTIN.

- ✓ **French Drosophila Meeting (FDM)**

Du 7 au 10 novembre 2017 à Presqu'Île de Giens (France)

Poster : "*Characterization of the functional role of a new small RNA (snoARN), jouvence, in lipid metabolism and longevity in Drosophila.*"

**S. SOULE**, L. MELLOOTTEE & J.R. MARTIN.

- ✓ **Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI)**

Du 24 au 25 mai 2018 à Versailles (France)

Présentation orale : *"ninaD, a gene deregulated in the snoARN jouvence mutant, is involved in lipid and cholesterol metabolism in the gut and modulates lifespan in Drosophila."*

**S. SOULE**, L. MELLOOTEE & J.R. MARTIN.

✓ **Drosoph'Île-de-France (DIF-Day)**

Le 14 juin 2018 au Collège de France à Paris (France)

Présentation orale : *"jouvence, a new Drosophila snoARN expressed in enterocytes, affects the length of the gut."*

**S. SOULE**, L. MELLOOTEE & J.R. MARTIN.

✓ **French Drosophila Meeting (FDM)**

Du 9 au 12 octobre 2018 à Presqu'Île de Giens (France)

Poster : *"Characterization of the functional role of a new small RNA (snoARN), jouvence, in lipid metabolism and longevity in Drosophila ."*

**S. SOULE**, L. MELLOOTEE & J.R. MARTIN.

✓ **Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI)**

Du 16 au 17 mai 2019 à Orléans (France)

Présentation orale : *"ninaD, a deregulated gene in the jouvence snoARN mutant, modulates lifespan through intestinal cholesterol and lipid metabolism."*

**S. SOULE**, L. MELLOOTEE & J.R. MARTIN.

✓ **Drosoph'Île-de-France (DIF-Day)**

Le 13 juin 2019 à L'institut du Cerveau et de la Moelle Epinière à Paris (France)

Présentation orale : *"jouvence, a new snoARN, modulates lifespan by preventing the intestinal dysplasia in Drosophila."*

**S. SOULE**, L. MELLOOTEE & J.R. MARTIN.

## **PARTICIPATION A L'ORGANISATION D'ÉVÉNEMENTS SCIENTIFIQUES**

✓ **NeuroPSI Talents Day (1<sup>ère</sup> édition)**

Le 4 juin 2019 à Gif-sur-Yvette (France)

D. AMARENTE, K. DUARTE, C. LHOPITALIER, J. ROYER, M. RUSSO, **S. SOULE** & L. TIROU.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	12
LISTE DES TABLEAUX .....	15
ABREVIATIONS .....	16
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	20
1. Vieillessement .....	20
1.1. Contexte actuel .....	20
1.2. Causes de la détérioration physiologique associée à l'âge .....	25
1.2.1. L'instabilité génomique .....	27
1.2.2. L'usure des télomères .....	28
1.2.3. L'altération épigénétique .....	30
1.2.4. Déteioration de la réponse aux protéines dépliées .....	32
1.2.5. La dérégulation de la sensibilité aux nutriments .....	34
1.2.6. Défaillance des mitochondries .....	36
1.2.7. La sénescence cellulaire .....	38
1.2.8. L'épuisement des cellules souches .....	41
1.2.9. L'altération de la communication intercellulaire .....	44
2. Les accélérateurs du vieillissement .....	47
3. Des stratégies anti-vieillessement .....	49
3.1. Ces facteurs environnementaux qui régulent le vieillissement .....	51
3.1.1. Les vertus de la restriction calorique pour prolonger la durée de vie .....	52
3.1.2. Les mimétiques de la restriction calorique .....	54
a. Le resvératrol, composé phénolique le plus prometteur .....	54
b. La metformine, du diabète à la longévité .....	55
c. La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR .....	56
3.1.3. Les effets bénéfiques d'une restriction de protéines .....	57
3.2. Ces facteurs génétiques qui influencent le vieillissement .....	58
3.2.1. Les voies de signalisation impliquées dans le processus de vieillissement .....	59
a. La voie de signalisation à l'insuline/IGF (IIS) .....	59
i. Définition .....	60
ii. Une fonction conservée de la signalisation de l'insuline/IGF dans la longévité des organismes .....	63
🚩 Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	63
🚩 La mouche <i>Drosophila melanogaster</i> .....	64
🚩 La souris <i>Mus musculus</i> .....	67
🚩 L'Homme <i>Homo sapiens</i> .....	68
b. La voie de la cible de la rapamycine (mTOR) .....	69
i. Définition .....	69



ii.	La voie mTOR dans le processus de vieillissement .....	72
c.	La voie de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) .....	74
3.2.2.	Des exemples de gènes individuels qui favorisent la longévité .....	76
a.	methuselah (mth), le premier gène de longévité chez la drosophile .....	76
b.	Indy, un gène associé à une longévité exceptionnelle .....	77
c.	Les sirtuines, une famille de gènes déterminants pour la longévité .....	79
d.	Dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif et vieillissement .....	81
i.	Une respiration mitochondriale réduite favorise la longévité .....	82
ii.	PCG-1 $\alpha$ , un gène suppresseur de vieillissement .....	84
3.2.3.	Les ARN non-codant, des nouvelles cibles dans le processus de vieillissement et la longévité .....	85
a.	Les microARN, des ARN non-codant pour réguler l'expression des gènes .....	87
i.	Définition .....	88
ii.	Production de microARN canoniques .....	89
iii.	Le rôle des microARN dans la longévité .....	90
b.	D'autres ARN non-codants ayant des fonctions potentielles dans le vieillissement .....	92
i.	Les ARN interagissant avec les protéines PIWI .....	93
ii.	Les longs ARN non-codants .....	94
c.	Les snoARN, un nouveau marqueur non-établi de la longévité et du processus de vieillissement .....	96
i.	Définition .....	97
ii.	Architecture des différentes familles de snoRNP .....	99
✚	Les snoRNP à boîtes C/D .....	100
✚	Les snoRNP à boîtes H/ACA .....	102
iii.	Du petit ARN nucléolaire précurseur au complexe de petite ribonucléoprotéine nucléolaire fonctionnelle .....	105
✚	Transcription et maturation des snoARN .....	105
•	Les gènes des snoARN avec des promoteurs indépendants .....	106
•	Les gènes des snoARN introniques .....	108
✚	Assemblage et trafic intracellulaire des snoRNP à boîtes C/D et H/ACA .....	110
•	Le cheminement de l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes .....	111
•	Modèle d'assemblage des snoRNP H/ACA chez les eucaryotes .....	114
iv.	La diversité fonctionnelle des snoRNP .....	116
✚	Modifications chimiques et maturation des pré-ARNr .....	117
✚	Les snoARN peuvent être les précurseurs naturels de petits ARN non-codant fonctionnels régulant l'expression des gènes .....	119
•	Les snoARN-miARN .....	119
•	Les snoARN-ARNpi .....	120
✚	Caractérisation des snoRNP associés à la chromatine .....	120
✚	Contrôle du taux de production d'ARNm cellulaires .....	121
✚	Les snoARN dans la régulation de l'épissage alternatif .....	122

✚ Les lncARN liés aux snoARN .....	123
4. Modifications des principaux systèmes physiologiques durant le processus de vieillissement .....	124
4.1. L'intestin de la drosophile .....	125
4.1.1. Description anatomique du tube digestif .....	125
4.1.2. Régionalisation fonctionnelle de l'intestin moyen .....	128
4.1.3. Etude de la plasticité intestinale .....	132
a. Les mécanismes nécessaires à la plasticité du tube digestif .....	132
b. Effets du vieillissement sur l'appareil digestif de la drosophile .....	138
4.2. Le système nerveux central de la drosophile .....	139
4.3. Le corps gras de la drosophile .....	141
<b>HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL .....</b>	<b>145</b>
✚ Approche cellulaire et organismique .....	145
✚ Approche métabolique .....	146
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>148</b>
1. Maintien des lignées stock de drosophile .....	148
2. Genèse de lignées transgéniques .....	152
3. Expériences de longévité .....	153
4. Analyse transcriptomique (Séquençage d'ARN) .....	153
4.1. Extraction des ARN totaux .....	154
4.2. Traitement à la DNase et purification des ARN totaux .....	155
4.3. Préparation de la bibliothèque et séquençage de l'ARN .....	155
5. Validation des données issues de l'analyse transcriptomique par qRT-PCR .....	157
5.1. Transcription inverse .....	157
5.2. PCR quantitative .....	157
6. Homéostasie cellulaire de l'épithélium intestinal .....	159
6.1. Dissection d'intestin de drosophile adulte .....	159
6.2. Quantification du nombre d'entérocytes .....	160
6.3. Marquage des autres types cellulaires de l'intestin .....	161
6.4. Evaluation de l'activité proliférative des cellules souches intestinales .....	161
6.4.1. Etude de la division cellulaire .....	161
6.4.2. Incorporation à l'EdU .....	162
6.5. Détermination de la quantité d'ADN et de la taille des entérocytes .....	162
7. Analyse de la physiologie intestinale .....	163
7.1. Mesure de la longueur de l'intestin .....	163
7.2. Marquage et comptage des muscles viscéraux exprimant le <i>Dilp3</i> .....	163
8. Etude de l'homéostasie métabolique .....	163
8.1. Quantification des paramètres métaboliques .....	163
8.1.1. Dosage du cholestérol .....	164
8.1.2. Dosage du glucose .....	164
8.1.3. Dosage des protéines .....	165
8.1.4. Dosage du tréhalose .....	165

8.1.5.	Dosage des triglycérides .....	165
8.2.	Visualisation des lipides dans l'intestin .....	166
8.2.1.	Coloration des gouttelettes lipidiques .....	166
8.2.2.	Marquage des lipides neutres .....	166
8.3.	Visualisation de la distribution du cholestérol libre dans les membranes cellulaires .....	167
9.	Détermination du profil d'expression de <i>ninaD</i> .....	167
9.1.	Localisation cellulaire (profil d'expression) .....	167
9.2.	Localisation subcellulaire .....	167
10.	Evaluation de la neurodégénérescence .....	168
10.1.	Histologie des cerveaux .....	168
10.2.	Méthode de quantification des lésions vacuolaires .....	168
11.	Préparation de la sonde d'ARN et hybridation <i>in situ</i> .....	169
12.	Analyses statistiques et présentations des données .....	170

## **RÉSULTATS ..... 171**

### **Chapitre 1 : Le rôle de *jouvence* sur l'homéostasie cellulaire de l'épithélium intestinal ..... 171**

1.	Introduction .....	171
1.1.	Préambule .....	171
1.2.	Plasticité de l'épithélium intestinal au cours du vieillissement .....	173
2.	Résultats .....	174
2.1.	Résultats publiés .....	174
2.2.	Résultats complémentaires non publiés .....	175
2.2.1.	Etude de l'homéostasie de l'épithélium intestinal suite à la perte de <i>jouvence</i> .....	175
2.2.1.1.	Augmentation associée à l'âge du nombre de cellules proliférantes dans l'intestin des mutants nuls pour <i>jouvence</i> .....	175
2.2.1.2.	<i>jouvence</i> induit des changements dans l'activité proliférative des CSI .....	177
2.2.2.	<i>jouvence</i> stimule l'endoréplication et la croissance cellulaire des EC .....	179
3.	Discussion .....	181

### **Chapitre 2 : Détermination du rôle de *jouvence* dans le métabolisme énergétique ..... 184**

1.	Introduction .....	184
2.	Résultats .....	185
2.1.	Validation des données obtenues avec le séquençage d'ARN .....	185
2.1.1.	Validation des données de l'analyse transcriptomique par qRT-PCR .....	185
2.1.2.	La modulation des niveaux des gènes dérégulés par la mutation de <i>jouvence</i> influence la durée de vie de l'organisme .....	188
2.2.	La perte de <i>jouvence</i> altère l'expression de gènes impliqués dans des processus métaboliques lipidiques .....	192
2.3.	Evaluation du profil métabolique .....	195
2.3.1.	Les mouches sans <i>jouvence</i> présentent des défauts métaboliques .....	195
2.3.2.	Effet de l'expression de <i>jouvence</i> dans l'intestin sur l'homéostasie métabolique .....	197
3.	Discussion .....	199

3.1.	Les mutants <i>jouvence</i> présentent un phénotype d'obésité .....	199
3.2.	La déficience de <i>jouvence</i> perturbe le trafic du cholestérol .....	202
<b>Chapitre 3 : Caractérisation du rôle de <i>ninaD</i> dans l'homéostasie du cholestérol .....</b>		<b>205</b>
1.	Introduction .....	205
2.	Résultats .....	207
2.1.	Résultats prochainement soumis .....	207
2.2.	Résultats non publiés .....	209
3.	Discussion .....	214
3.1.	Une fonction de <i>ninaD</i> dans l'homéostasie du cholestérol .....	214
3.2.	La fonction intestinale de <i>ninaD</i> fournit une neuroprotection .....	216
<b>Chapitre 4 : Rôle de <i>jouvence</i> dans le développement et la physiologie intestinale .....</b>		<b>218</b>
1.	Introduction .....	218
2.	Résultats .....	220
2.1.	<i>jouvence</i> régule la taille de l'intestin de la drosophile adulte .....	220
2.2.	La production locale d'insuline est nécessaire pour la croissance intestinale .....	222
2.2.1.	L'expression du snoARN <i>jouvence</i> dans les cellules musculaires exprimant le <i>Dilp3</i> a entraîné une augmentation de la taille de l'intestin .....	223
2.2.2.	La réduction de la taille de l'intestin chez les mutants est due à une diminution dans l'expression de <i>Dilp3</i> .....	226
2.3.	Importance de <i>Dilp3</i> dans la survie des mouches .....	227
3.	Discussion .....	229
3.1.	Redimensionnement de l'intestin des mouches déficientes pour <i>jouvence</i> .....	229
3.2.	Le contrôle de la croissance par IIS est conservé au cours de l'évolution .....	230
<b>Chapitre 5 : Rôle de <i>jouvence</i> dans l'organisation structurale des particules ribonucléoprotéiques (RNP) de type H/ACA .....</b>		<b>232</b>
1.	Introduction .....	232
2.	Résultats .....	233
2.1.	Conséquences de la déplétion des ARNm des protéines associées aux snoARN par l'ARNi .....	233
2.2.	La diminution ou l'absence des protéines du RNP à boîtes H/ACA favorise l'extension de la durée de vie .....	235
3.	Discussion .....	236
<b>DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>238</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>242</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>263</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> – Population par âge en 2020 et 2070.	<b>22</b>
<b>Figure 2</b> – Part des personnes déclarant une maladie ou un problème de santé chronique ou durable selon le sexe et l'âge en 2017.	<b>25</b>
<b>Figure 3</b> – Vue d'ensemble des caractéristiques du phénotype de vieillissement.	<b>27</b>
<b>Figure 4</b> – Instabilité génomique, rétrécissement des télomères et altération épigénétiques.	<b>31</b>
<b>Figure 5</b> – Perte de l'homéostasie des protéines.	<b>34</b>
<b>Figure 6</b> – Dérégulation des senseurs nutritifs et dysfonctionnement mitochondrial.	<b>38</b>
<b>Figure 7</b> – Sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et altération de la communication intercellulaire.	<b>43</b>
<b>Figure 8</b> – Impact métabolique des caractéristiques du vieillissement.	<b>46</b>
<b>Figure 9</b> – Facteurs extrinsèques responsables du vieillissement.	<b>49</b>
<b>Figure 10</b> – Les stratégies pour ralentir le vieillissement.	<b>51</b>
<b>Figure 11</b> – Cascade d'activation de la voie de signalisation à l'insuline/IGF, conservée au cours de l'évolution.	<b>62</b>
<b>Figure 12</b> – Organisation structurale des complexes mTORC1 et mTORC2.	<b>70</b>
<b>Figure 13</b> – Ensemble des voies de signalisation autour des complexes mTORC1 et mTORC2.	<b>72</b>
<b>Figure 14</b> – Biogenèse et un exemple de la fonction de certaines classes d'ARN non-codants existantes.	<b>87</b>
<b>Figure 15</b> – Biogenèse et fonctions post-transcriptionnelles des microARN.	<b>89</b>
<b>Figure 16</b> – Structure des snoRNP à boîtes C/D.	<b>101</b>
<b>Figure 17</b> – Caractéristiques structurales des snoRNP à boîtes H/ACA.	<b>104</b>
<b>Figure 18</b> – Organisation génomique des unités transcriptionnelles codant des snoARN.	<b>106</b>
<b>Figure 19</b> – Étapes de maturation des snoARN indépendants.	<b>108</b>
<b>Figure 20</b> – Voie de synthèse des snoARN introniques.	<b>110</b>
<b>Figure 21</b> – Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D.	<b>114</b>
<b>Figure 22</b> – Processus d'assemblage et de maturation des snoRNP à boîtes H/ACA.	<b>116</b>
<b>Figure 23</b> – Schéma du système digestif adulte de la drosophile.	<b>127</b>
<b>Figure 24</b> – Aperçu des régions de l'intestin moyen.	<b>129</b>
<b>Figure 25</b> – Un aperçu de la diversification fonctionnelle des régions de l'intestin de la drosophile.	<b>131</b>
<b>Figure 26</b> - Composition cellulaire générale du tube digestif.	<b>133</b>

<b>Figure 27</b> - Mécanismes de régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches intestinales.	<b>135</b>
<b>Figure 28</b> - Lignage de l'intestin adulte de la drosophile.	<b>137</b>
<b>Figure 29</b> – Visualisation du cerveau d'une drosophile adulte.	<b>141</b>
<b>Figure 30</b> – Modèle de stockage et de mobilisation des lipides dans le corps gras de la mouche.	<b>143</b>
<b>Figure 31</b> – L'axe cerveau - corps gras.	<b>144</b>
<b>Figure 32</b> - Processus de dissection de l'intestin d'une mouche adulte.	<b>160</b>
<b>Figure 33</b> – Carte génomique du locus P[GAL4]4C.	<b>173</b>
<b>Figure 34</b> – La mutation de <i>jouvence</i> a affecté les CSI dans l'intestin moyen.	<b>176</b>
<b>Figure 35</b> – Augmentation du nombre de cellules <i>Esg<sup>+</sup></i> chez les mouches vieillissantes.	<b>176</b>
<b>Figure 36</b> – <i>jouvence</i> régule la prolifération des CSI.	<b>178</b>
<b>Figure 37</b> – La perte de <i>jouvence</i> endommage l'activité proliférative des CSI.	<b>179</b>
<b>Figure 38</b> – Les cellules endoréplicatives des mouches mutantes ont des noyaux plus petits.	<b>180</b>
<b>Figure 39</b> – Validation par qRT-PCR des gènes dérégulés par la mutation de <i>jouvence</i> .	<b>188</b>
<b>Figure 40</b> – Effet de la modulation de l'expression des gènes dérégulés sur la longévité.	<b>190</b>
<b>Figure 41</b> – Les niveaux d'expression des gènes candidats dans l'intestin analysés par qRT-PCR.	<b>194</b>
<b>Figure 42</b> – Caractérisations physiologiques des mutants délétés pour <i>jouvence</i> dans des conditions d'alimentation normales.	<b>196</b>
<b>Figure 43</b> – Modulation du poids corporel et de l'activité métabolique par l'expression de <i>jouvence</i> dans l'épithélium intestinal.	<b>198</b>
<b>Figure 44</b> – Profil d'expression du gène <i>ninaD</i> aux stades larvaires et adultes dans divers tissus.	<b>207</b>
<b>Figure 45</b> - Structures primaires des deux isoformes de la protéine <i>ninaD</i> .	<b>207</b>
<b>Figure 46</b> – L'expression de l' <i>UAS-RNAi-ninaD</i> dans les EC module le poids corporel et l'homéostasie glucidique.	<b>209</b>
<b>Figure 47</b> – Evaluation de l'état métabolique des mouches avec une expression temporelle du transgène <i>UAS-RNAi-ninaD</i> dans l'intestin.	<b>210</b>
<b>Figure 48</b> – Effet de l'expression ciblée du transgène <i>UAS-RNAi-ninaD</i> dans le corps sur l'activité métabolique.	<b>211</b>
<b>Figure 49</b> – Evaluation des paramètres métaboliques des mutants nul <i>ninaD<sup>P245</sup></i> et des doubles mutants <i>F4, ninaD<sup>P245</sup></i> .	<b>212</b>
<b>Figure 50</b> – La mutation de <i>jouvence</i> augmente le stockage des lipides dans l'intestin moyen.	<b>214</b>

<b>Figure 51</b> – <i>jouvence</i> est impliqué dans la croissance intestinale.	<b>221</b>
<b>Figure 52</b> – Visualisation de l’expression du gène <i>Dilp3</i> dans les muscles de l’intestin moyen.	<b>223</b>
<b>Figure 53</b> – La perte des snoARN a affecté le nombre de cellules musculaires exprimant le <i>Dilp3</i> dans l’intestin.	<b>224</b>
<b>Figure 54</b> – Les snoARN favorisent la croissance de l’intestin grâce à l’expression de <i>Dilp3</i> .	<b>225</b>
<b>Figure 55</b> – Confirmation par qRT-PCR en temps réel de la diminution de la quantité d’ARNm du <i>Dilp3</i> dans l’intestin.	<b>227</b>
<b>Figure 56</b> – L’expression des snoARN dans les fibres musculaires de l’intestin exprimant le <i>Dilp3</i> améliore la durée de vie des mouches.	<b>228</b>
<b>Figure 57</b> – La diminution des ARNm, et conséquemment de leurs protéines, des particules RNP affecte la structure nucléaire et nucléolaire des EC.	<b>234</b>
<b>Figure 58</b> - Effets du knock-down des composants du RNP médié par l’ARNi sur la longévité.	<b>236</b>
<b>Figure 59</b> - Mise à jour de la carte génomique du locus du snoARN <i>jouvence</i> .	<b>241</b>

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> – Evolution de l'espérance de vie à la naissance depuis 1950.	<b>22</b>
<b>Tableau II</b> – Evolution de l'espérance de vie à 65 ans depuis 1950.	<b>23</b>
<b>Tableau III</b> – Population par grand groupe d'âge de 2013 à 2070.	<b>23</b>
<b>Tableau IV</b> – Evolution et projection du nombre de centenaires depuis 1950.	<b>23</b>
<b>Tableau V</b> – Liste des lignées pilote <i>GAL4</i> et <i>GAL4-GS</i> utilisées.	<b>150</b>
<b>Tableau VI</b> – Liste des transgènes UAS utilisées.	<b>151</b>
<b>Tableau VII</b> – Les séquences d'oligonucléotides pour les vérifications en PCR.	<b>152</b>
<b>Tableau VIII</b> – Liste des autres lignées utilisées.	<b>152</b>
<b>Tableau IX</b> – Les séquences d'oligonucléotides pour la génération de transgènes.	<b>153</b>
<b>Tableau X</b> – Les séquences des amorces utilisés pour les qPCR.	<b>158</b>
<b>Tableau XI</b> – Les 2% des gènes les plus dérégulés par la mutation <i>jouvence</i> dans chaque liste.	<b>186</b>
<b>Tableau XII</b> – Gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dont l'expression est modulée dans l'intestin par la mutation de <i>jouvence</i> .	<b>193</b>
<b>Tableau XIII</b> – Les <i>Dilp</i> dont l'expression est dérégulée dans l'intestin des insectes dépourvus de <i>jouvence</i> .	<b>220</b>
<b>Tableau SI</b> – Résumé statistique des tests de longévité.	<b>263</b>



# ABBREVIATIONS

**4E-BP1** : eIF4E binding protein

**$\alpha$ -est1** :  $\alpha$ -estérase

**$\alpha$ Tub84B** :  $\alpha$ -Tubuline 84B

**$\Psi$**  : Pseudouridine

## A

**AA** : Acides amines

**AAA<sup>+</sup>** : ATPases Associated with diverse Activities

**ABC** : ATP binding cassette

**ac** : Acétylation

**ACAT** : Acyl-CoA cholestérol acyltransférase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc/cDNA** : ADN complémentaire

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**ADNn** : ADN nucléaire

**ADN/ARNnc** : ADN/ARN non-codant

**ADNr** : ADN ribosomal

**AG** : Acides gras

**Age-1** : Ageing alteration 1

**AGO** : Argonaute

**AKH** : Hormone adipokinétique

**AKHR** : Récepteur d'AKH

**Akt-1/2** : RAC-alpha/beta serine-threonine-protein kinase

**AMP** : Adenosine monophosphate

**AMPK** : AMP-activated protein kinase

**ANG** : Angiogenin

**ARE** : AU-rich element RNA-binding *protein* 1

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNi/RNAi** : Acide ribonucléique interférent

**ARNm** : ARN messenger

**ARNpi** : ARN interagissant avec les protéines PIWI

**ARNt** : ARN de transfert

**Ast** : Allatostatine

**ATGL** : Adipose trilular glyceride lipase

**ATM** : Ataxia-telangiectasia mutated

**ATP** : Adénosine triphosphate

**ATR** : Ataxia- and Rad3-related

**Aub** : Aubergine

**AUF1** : ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1

**AVC** : Accident vasculaire cérébral

## B

**BER** : Réparation par excision de base

**BET** : Bromure d'éthidium

**BIRC6** : Baculoviral IAP repeat containing 6

**Bmm** : Brummer

**BUB1B** : Mitotic checkpoint serine/threonine kinase B

## C

***C. elegans*** : *Caenorhabditis elegans*

**caARN** : ARN associé à la chromatine

**Cbp-1** : CREB-binding protein homolog 1

**CC** : *Corpus cardiacum*

**CD4/36** : Cluster de Différenciation 4/36

**CDC42** : Cell division control protein 42 homolog

**CEE** : Cellules entéro-endocrines

**CG6296** : Triacylglycerol lipase family

**CHORD** : Cysteine- and histidine-rich domain

**clk-1** : Clock (biological timing) abnormality 1

**CPSF** : Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor

**CPT** : Centre peptidyl transférase

**CREB** : C-AMP response element-binding protein

**CRHR1** : Corticotropin-releasing hormone receptor 1

**CRM1** : Chromosomal maintenance 1

**CS** : Canton-Spécial

**CSGa/GaSC** : Cellules souches gastriques

**CSH (HSC)** : Cellules souches hématopoïétiques

**CSI** : Cellules souches intestinales

**CTD** : Carboxy-terminal domain

**CTP-1** : Citrate transport protein 1

**CTR1B** : Copper transporter 1B

**Cyp4p1/2** : Cytochrome P450-4p1/2

## D

***D. melanogaster*** : *Drosophila melanogaster*

**Daf** : Abnormal dauer formation

**DAG** : Diacylglycérides/Diacylglycérols

**Da-GAL4** : Daughterless-GAL4

**DBR1** : Lariat debranching enzyme

**DEPTOR** : DEP domain containing mTOR-interacting protein

**DF31** : Decondensation factor 31

**DGCR8** : DiGeorge syndrome critical region 8

**DGRC** : *Drosophila* Genomics Resource Center

**DH31** : Hormone diurétique 31

**DIG** : Digoxygénine

**Dilp1 – 8** : *Drosophila* insulin-like peptides 1 – 8

**DKC1** : Dyskérine

**DI** : Delta

**DnaJ-H** : DnaJ homolog

**DNase** : Désoxyribonucléase

**DNA-PKcs** : DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit

**dNTP** : désoxyribonucléotides

**DPM2** : Dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 2

**DRO** : Dérivés réactifs de l'oxygène

**dUTP** : Déoxyuridine Triphosphate

## E

**E2F7** : E2F transcription factor 7

**EB** : Entéroblastes

**EC** : Entérocyte

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétracétate

**EdU** : 5-éthynyle-2'-deoxyuridine

**EGFR** : Epidermal growth factor receptor

**EGTA** : Ethylene glycol tetraacetic acid

**Eip74EF** : Ecdysone-induced protein 74EF

**ELAVL1** : ELAV like RNA binding protein 1

**ENCODE** : Encyclopedia of DNA Elements

**ER** : Réticulum endoplasmique

**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase

**ERO/ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**ERR- $\alpha$**  : Estrogen-related receptor  $\alpha$

**Esg-GAL4** : Escargot-GAL4

**ETC** : Chaîne de transport des électrons

## F

**FAS** : Fatty acid synthase

**FAT** : FRAP, ATM et TRRAP

**FATC** : FAT carboxy-terminal

**FATP** : Fatty acid transport protein

**FGFR3** : Fibroblast growth factor receptor 3

**Fip1** : Factor interacting with poly(A) polymerase 1

**FIRKO** : Fat-specific Insulin Receptor Knock Out

**FKBP12** : FK506-binding protein 12kD

**FKH** : Forkhead

**FPKM** : Fragments per kilobase million

**FKHRL1** : FKHR-like 1

**FOX** : Forkhead box

**FOXO** : Forkhead box, sub-group O

**FRB** : FKBP-rapamycin binding

**FSH** : Hormone folliculo-stimulante

**G**

**GAL4-GS** : GAL4 Gene Switch  
**GAP** : GTPase Activating Protein  
**GAR1** : Glycin/arginine rich domain  
**Gba1a** : Glucosylcérosidase 1a  
**GFP** : Green fluorescent protein  
**GH** : Growth Hormone  
**GHR** : Récepteur de l'hormone de croissance  
**GLUT4** : Glucose transporter type 4

**GnRH** : Gonadotropin-releasing hormone

**GstE5** : Glutathione S transférase E5  
**GTC** : Thiocyanate de guanidine  
**GTP** : Guanosine triphosphate

**H**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**HDL** : High density lipoprotein  
**HEAT** : Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR  
**HEIH** : Hepatocellular carcinoma up-regulated EZH2-associated long non-coding RNA  
**Hh** : Hedgehog  
**HIF-1 $\alpha$**  : Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$   
**HNF-4  $\alpha$**  : Hepatocyte nuclear factor-4  
**HOTAIR** : Hox antisense intergenic RNA  
**HP1 $\alpha$**  : Heterochromatin protein 1 $\alpha$   
**HR** : Réparation par recombinaison homologue  
**Hsc70 (HSPA8)** : Heat shock cognate 71 kDa protein  
**HSF-1** : Heat Shock Factor protein 1  
**HSP** : Heat shock proteins  
**HULC** : Hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA  
**hVps34** : Human vacuolar protein sorting 34

**I**

**IgG** : Immunoglobuline G  
**IGF-1** : Insulin-like growth factor 1  
**IGF-1R** : Récepteur de l'IGF-1  
**IIS** : Voie de signalisation de l'insuline/IGF-1  
**IL-** : Interleukine(s)  
**IMD** : Immune deficiency  
**Indy** : I'm not dead yet  
**INED** : Institut National d'Etudes Démographiques  
**InR/IR** : Insulin-like receptor  
**INS1 - 38** : Insulin-like peptides 1 - 38  
**INSEE** : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques  
**IPC** : *Pars intercerebralis*  
**IR** : Rayonnement infrarouge  
**IRS1 - 4** : Insulin Receptor Substrates  
**Isp-1** : Iron-sulfur protein 1  
**IST-1** : Insulin receptor substrate homolog

**J - K**

**JAK/STAT** : Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription  
**JNK** : Jun N-terminal kinase  
**kDa** : Kilodalton  
**KD** : Knock-down  
**KEGG** : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
**K-turn** : Kink-turn

**L**

**l(2)03659** : Lethal(2)03659  
**LDL** : Low Density Lipoprotein  
**LFC** : Large flat cells  
**LH** : Hormone lutéinisante  
**Lip4** : Lipase 4  
**lncARN** : Long ARN non-codant  
**LSD1/2** : Lipid storage droplet 1/2

**Lsp2** : Larval serum protein 2  
**LysB** : Lysozyme B

**M**

**M. musculus** : *Mus musculus*  
**m<sup>2,2,7</sup>GpppN/m<sup>3</sup>GpppG** : Coiffe 2,2,7-triméthylguanosine  
**m<sup>3</sup>G** : Coiffe triméthylée  
**m<sup>7</sup>GpppG/m<sup>7</sup>G** : Coiffe 7-méthylguanosine  
**MalA1/3** : Maltase A1/3  
**MALAT1** : Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1  
**MAP4K3** : Mitogen-activated protein kinase 3  
**MAPK** : Protéines kinases activées par les mitogènes  
**MCAD** : Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase  
**MDR50** : Multi drug resistance 50  
**me** : méthylation  
**MEF2C** : Myocyte enhancer factor 2  
**Mex** : Malic enzyme modifier

**MHC-GAL4** : Myosin heavy chain-GAL4

**miARN/mir** : microARN  
**mLST8** : Mammalian lethal with Sec13 protein 8  
**M-MLV** : Moloney murine leukemia virus  
**MMR** : Réparation des mésappariements  
**Mn-SOD** : Superoxyde dismutase à manganèse  
**MSC** : Cellules souches mésenchymateuses  
**mSIN1** : Mammalian SAPK-interacting protein 1  
**mth** : Methuselah  
**mth8** : Methuselah-like 8  
**mTOR** : Mechanistic/mammalian target of rapamycin  
**mTORC1/2** : Mammalian target of rapamycin complex 1/2  
**mtTFA** : Facteur de transcription mitochondrial A  
**MTTP** : Microsomal triacylglycerol transfer protein  
**MUH** : Modular UAS heat shock promoter  
**MYO1A** : Myosine 1A

**N**

**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
**NAF1** : Nuclear assembly factor  
**NCBI** : National Center for Biotechnology Information  
**NER** : Réparation par excision des nucléotides  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor- $\kappa$ B  
**NHEJ** : Jonction d'extrémités non-homologues  
**NHP2** : Non-histone protein 2  
**NIG-Fly** : National Institute of Genetics  
**ninaD** : Neither inactivation for afterpotential D  
**NLRP3** : NOD-like receptor family, pyrin domain containing  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NOP1/10/56/58** : Nucleolar protein 1/10/56/58

**NOPP140** : Nucleolar phosphoprotein 140

**NPC** : Niemann-Pick de type C  
**NRF-1/2** : Nuclear respiratory factor 1/2  
**nsyb-GAL4** : n-synaptobrevin-GAL4  
**nt** : Nucléotides

**O**

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde  
**<sup>•</sup>OH** : Radical hydroxyle  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**ONOO<sup>-</sup>** : Anion peroxydinitrite  
**OXPHOS** : Phosphorylation oxydative

**P - Q**

**P** : Phosphorylation  
**p21** : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

**p53** : Tumor protein 53  
**PA** : Acide phosphatidique  
**PACT** : *Protein activator of PKR*  
**PAS** : Site de polyadénylation  
**Pasha** : Partner of DROSHA  
**pARNi** : Petit ARN interférent  
**pb** : Paire de bases  
**PB** : Point de branchement  
**PBRM1** : Polybromo 1  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase  
**PDGF** : Platelet-derived growth factor  
**PDK-1** : Pyruvate dehydrogenase kinase 1  
**Pdm1** : POU domain protein 1  
**PEPCK** : Phosphoénolpyruvate carboxykinase  
**PERC** : PGC-1 related estrogen receptor coactivator  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**PGC-1 $\alpha$**  : Peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator-1 $\alpha$   
**PGRP** : Protéines de reconnaissance des peptidoglycanes  
**pH3** : Phospho-Histone H3  
**PHAX** : Phosphorylated adaptator for RNA export  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase  
**PIH1D1** : PIH1 domain-containing *protein* 1  
**PIKK** : Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-related kinases  
**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate  
**PIP3** : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate  
**Pit-1** : Pituitary specific transcription factor 1  
**PKC** : Protéine Kinase C  
**PKB** : Protéine Kinase B  
**PKR** : *Protein* kinase R  
**PLIN1/2** : Périlipine 1/2  
  
**PMP70** : Peroxisomal Membrane Protein 70 kDa  
  
**Poly(A)** : Polyadénylation  
**Pol II** : ARN Polymérase II  
**PPAR $\gamma$**  : Peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$   
**PRAS40** : Proline-rich AKT substrate of 40 kDa  
**PRC** : PGC-1 related coactivator  
**pRB** : Protéine du rétinoblastome  
**PRG-1/2** : PIWI related gene 1/3  
**PRL** : Prolactine  
**Prop-1** : Prophet of PIT-1  
**Pros** : Prospero  
**PTG** : Produit terminaux de glycation  
**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog  
**PUA** : Pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase  
**Puc** : Puckered  
**qRT-PCR** : PCR quantitative à transcription inverse

## R

**RACE-PCR** : Rapid amplification of cDNA-ends by PCR  
  
**RALGPS1** : Ral GEF With PH Domain And SH3 Binding Motif  
**RAPTOR** : Regulatory associated protein of TOR  
**RC** : Restriction calorique  
**RCPG** : Récepteurs couplés à une protéine G  
**RE** : Réticulum endoplasmique  
**RG** : Ring gland  
**Rheb** : Ras homolog enriched in brain  
**RISC** : RNA-induced silencing complex  
**RNase** : Ribonucléase  
**RNP** : Complexe ribonucléoprotéique  
**RNPnh** : Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes  
**RPAP3** : RNA polymerase II-associated protein 3  
**RpL37a** : Ribosomal protein L37a  
**RSK** : p90 Ribosomal S6 Kinase

**RTK** : Récepteur à activité Tyrosine Kinase  
**RUVBL1/2** : RuvB-like 1/2

## S

***S. cerevisiae*** : *Saccharomyces cerevisiae*  
**S6K1** : Ribosomal protein S6 kinase 1  
**SAC** : Spindle assembly checkpoint  
**sARN** : Petit ARN  
**scaARN** : Petit ARN spécifique des corps de Cajal  
**sdARN** : Petit ARN dérivé de snoARN  
**S.E.M** : Standard Error of the Mean  
**Ser** : Sérine  
**SGK** : Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase  
**Sir/SIRT** : Sirtuines  
**SMS** : Senescence-messaging secretome  
**snARN** : Petit ARN nucléaire  
**SNC** : Système nerveux central  
**snoARN** : Petit ARN nucléolaire  
  
**SNORA** : snoARN à boîtes H/ACA  
  
**SNORD** : snoARN à boîtes C/D  
**snoRNP** : Petite ribonucléoprotéine nucléolaire  
**SNU13** : Small nuclear ribonucleoprotein 13  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**Spz** : Spatzle  
**SR-BI** : Récepteur scavenger classe B type 1  
**SREBP** : Sterol regulatory element binding protein  
**Su(H)** : Suppressor-of-hairless  
**Sun** : Stunted  
**Surf1** : Surfeit locus protein 1

## T

**TAF1** : TBP-associated factor 1  
**TAG** : Triacylglycérides/Triacylglycérols  
**TAH1** : TPR (tetratricopeptide repeat)-containing *protein* associated with HSP90  
**TBE** : Tris-Borate-EDTA  
**TDP-43** : TAR DNA binding protein 43  
**TERRA** : Telomeric repeat-containing RNA  
**TERC** : Telomerase RNA component  
**TERT** : Telomerase reverse transcriptase  
**TFAM** : Facteur de transcription mitochondrial A  
**TG** : Triglycéride  
**TG11** : Tri-méthylguanosine synthase 1  
**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor- $\beta$   
**TGS1** : Trimethylguanosine synthase 1  
**Thr** : Thréorine  
**TK** : Tachykinine

**TLS** : Translesion synthesis

**T<sub>m</sub>** : Température d'hybridation

**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

**TRAMP** : Complexe de polyadénylation Trf4-Air2-Mtr4

**TRBP** : Trans-activation response RNA-binding *protein*

**tRF** : Fragments dérivés d'ARNt

**TSC1/2** : Tuberous sclerosis complex 1/2

**TSH** : Thyroestimuline

**tts-1** : Transcribed telomeric sequence 1

**Tab-GAL4-GS** : Tubulin-GAL4-GS

**Tyr-Cy3** : Tyramide-Cyanine 3

## U

**U** : Uridines

**UAS** : Upstream Activating Sequence

**Ub** : Ubiquitine

**Upd1** : Unpaired-1

**UDG** : Uracil-DNA Glycosylase

**ULK1** : Unc-51 like autophagy activating kinase

**UPR<sup>mt</sup>** : Mitochondrial unfolded protein response

**UTR** : Untranslated Transcribed Region

**UV** : Rayonnement ultraviolet

**V**

**VDRC** : Vienna *Drosophila* Resource Center

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**Vn** : Vein

**VNC** : Ventral nerval cord

**W – X – Y – Z**

**Wg/Wnt** : Wingless

**Xist** : X inactive specific transcrit

**XPO-1/5** : Exportine 1/5

**ZBTB37** : Zinc finger and BTB domain containing 37

**ZNHIT3/6** : Zinc finger HIT domain-containing *protein* 3/6

**Zuc** : Zucchini

# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

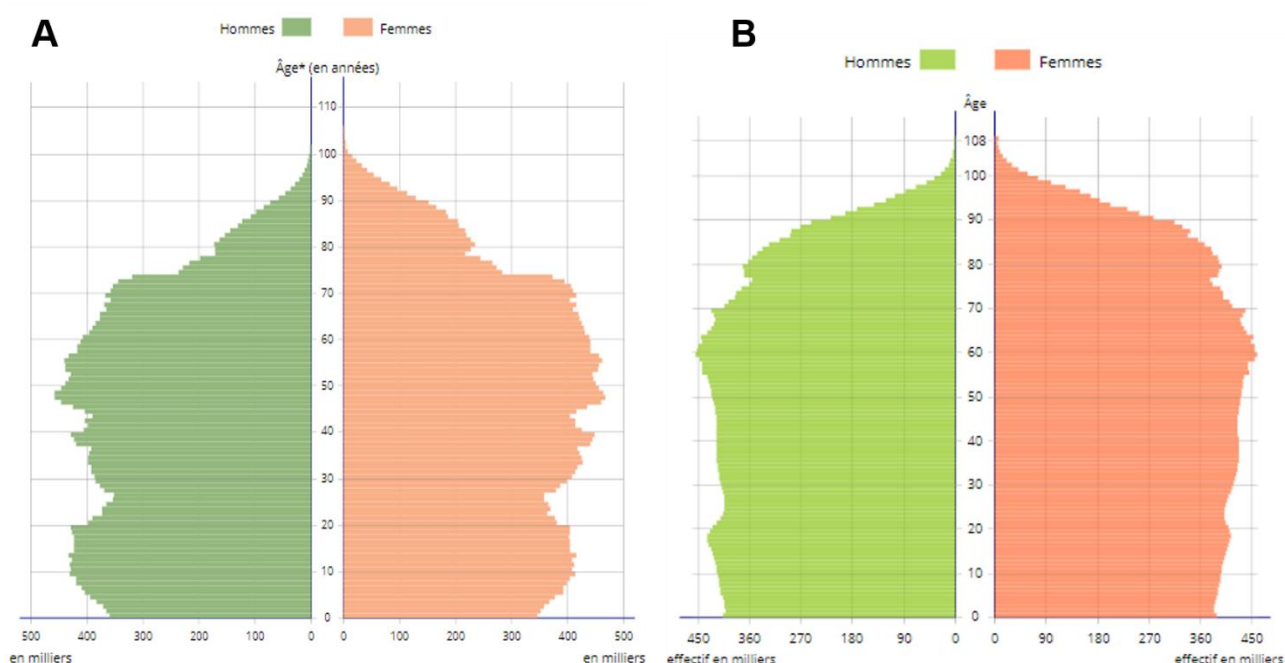
## 1. Vieillessement.

Le vieillissement est associé à de nombreux changements physiologiques, tels que la perte de fonction graduelle de plusieurs processus biologiques. Parallèlement à cette perte de fonction, il se produit une augmentation de l'incidence de diverses maladies reliées au vieillissement. En effet, la progression de l'espérance de vie observée au cours du XX<sup>ème</sup> siècle a été accompagnée par une augmentation massive de l'incidence des maladies reliées à l'âge. Malgré tous les progrès de la médecine moderne, l'augmentation de la durée de vie et la diminution de la mortalité, les maladies reliées au vieillissement restent un fardeau socio-économique important. Le contexte démographique actuel incite donc à se tourner vers de nouvelles recherches favorisant un vieillissement en bonne santé, sans pathologie.

### 1.1. Contexte actuel.

Le vieillissement connaît plusieurs définitions selon les sources et le contexte. Pour nombre d'entre elles et de manière générale dans la société, le vieillissement est associé à un critère d'âge. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit ainsi l'âge mûr à 65 ans. Cependant pour les spécialistes de l'étude du vieillissement, la notion d'âge n'est pas un bon critère de définition et ils font plutôt appel aux aspects biologiques et physiologiques. En effet, le vieillissement n'a que peu de rapport avec l'âge effectif en année. Certains possèdent à 80 ans des capacités physiques et mentales comparables à nombre de personnes de 20 ans. D'autres les voient décliner alors qu'ils sont bien plus jeunes. De ce fait, le vieillissement est décrit comme étant un phénomène naturel et dynamique, à distinguer des manifestations pathologiques, s'imposant à tous les êtres vivants dans la dernière période de leur vie, et dont le principal agent pro-vieillessement est l'accumulation du temps qui passe. L'organisme subit ainsi une série de transformations, croissantes au fil du temps, entraînant la dégénérescence de certaines cellules, ce qui provoque l'affaiblissement et le ralentissement des fonctions vitales et des modifications d'ordre physique, physiologique et psychique, selon des rythmes propres à chaque personne. De ce fait, le déclin progressif des capacités fonctionnelles, suite à l'accumulation de multiples formes de dommages qui varient entre les différents tissus et les organismes, compromet ainsi les chances de survie et conduit alors tout organisme vivant, après un laps de temps variable, à la mort. Cette période de vie est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques (intrinsèques) et de facteurs environnementaux (extrinsèques) auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie de manière marquée.

Le vieillissement est un phénomène planétaire. La recherche de la jeunesse éternelle a toujours été une idée centrale de l'histoire de l'humanité, car le vieillissement et, finalement, la mort représente un destin inévitable pour les organismes vivants. Aujourd'hui, pour la première fois dans l'histoire, les gens vivent plus longtemps partout dans le monde et la plupart des gens ont une espérance de vie supérieure à 60 ans. Selon l'OMS, le groupe d'âge des 60 ans et plus est celui qui croît le plus rapidement. Ceci est particulièrement dû à une diminution du taux de natalité et à l'augmentation de l'espérance de vie. Actuellement, les études montrent que l'espérance de vie et la longévité augmentent régulièrement en France (Tabl. I et II). Au 1<sup>er</sup> Janvier 2020, la France compte 64,9 millions d'habitants (d'après l'INED). Les personnes âgées d'au moins 65 ans représentent 20,5% de la population, contre 20,1% un an auparavant et 19,6% deux ans auparavant (Fig. 1A) (d'après INSEE). Cette part aurait progressé de 4,7 points en vingt ans. La hausse est de 2,4 points sur la même période pour les habitants âgés de 75 ans ou plus, qui représentent près d'un habitant sur dix au 1<sup>er</sup> Janvier 2020 (d'après l'INSEE). Selon les projections de la population de l'Institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE), si les tendances démographiques observées jusqu'ici se maintiennent, la France compterait 76,5 millions d'habitants au 1<sup>er</sup> Janvier 2070, soit 11,6 millions de plus qu'aujourd'hui. D'après ce scénario, la quasi-totalité de la hausse de la population d'ici 2070 concernerait les personnes âgées de 65 ans ou plus (d'après INSEE). En 2070, 24 millions de personnes seraient âgées de 60 ans et plus contre 13 millions en 2020, soit une hausse de près de 80% en 50 ans (Fig. 1B et Tabl. III). L'augmentation la plus forte concernerait les plus âgés. En effet, le nombre de personnes de plus de 75 ans s'élèverait de 6,3 millions en 2020 à 11,9 millions en 2070 et celui des plus de 85 ans de 1,4 à 5,4 millions (Fig. 1B) (d'après l'INSEE). Jusqu'en 2040, la proportion des personnes de 65 ans ou plus progresserait fortement (Tabl. III). A cette date, environ un habitant sur trois aurait 60 ans ou plus contre un sur cinq en 2020 (Tabl. III) (d'après l'INSEE). Cette forte augmentation est inéluctable et correspond à l'arrivée dans cette classe d'âges de toutes les générations issues du *baby-boom* nées après-guerre. Après 2040, la part des 65 ans ou plus continuerait à progresser mais plus modérément (Tabl. III). En 2070, la part des 60 ans et plus dans l'ensemble de la population française devrait passer de 20,5 à 28,7% (+8,2 points), ce qui demeure un mouvement important (Fig. 1B et Tabl. III) (d'après l'INSEE). De plus, elle pourrait également compter 270 000 centenaires contre 20 944 aujourd'hui (Tabl. IV). Le vieillissement de la population s'observe aussi dans le monde entier. Entre 2000 et 2050, la proportion de cette population mondiale des 60 ans ou plus doublera pour passer d'environ 11% à 22% (d'après l'OMS). En effet, on s'attend à ce que la population mondiale âgée de 60 ans et plus atteigne 2 milliards de personnes d'ici 2050, contre 605 millions en 2000 (d'après l'OMS). En outre, le nombre absolu de personnes âgées de 80 ans et plus sera, quant à lui, multiplié par quatre ou presque durant cette même période pour atteindre près de 395 millions (d'après l'OMS).



**Figure 1 – Population par âge en 2020 et 2070.**

(A) Pyramide des âges au 1<sup>er</sup> Janvier 2020 en France, y compris Mayotte. (B) Projections de la population française par âge au 1<sup>er</sup> Janvier 2070. En 2019, l'espérance de vie est de 79,8 ans pour les hommes et 85,7 ans pour les femmes en France métropolitaine. L'INSEE projette un allongement continu de l'espérance de vie d'ici à 2070. Cette année-là, elle devrait être de 86 ans pour les hommes et 91,1 ans pour les femmes. Les personnes âgées de 60 ans et plus sont au nombre de 13 millions aujourd'hui et elles seront 24 millions en 2070. Le nombre des plus de 75 ans passera de 6,2 million aujourd'hui à 11,9 millions en 2070. Source : D'après l'INSEE, Enquête SRCV, Calcul Drees.

Sexe/ Années	1950	1955	1960	1965	1970	1975	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2019
<b>Hommes</b>	63,4	65,2	67,0	67,5	68,4	69,0	70,2	71,3	72,7	73,9	75,3	76,8	78,0	79,0	79,8
<b>Femmes</b>	69,2	71,5	73,6	74,7	75,9	76,9	78,4	79,4	81,0	81,9	82,8	83,9	84,7	85,1	85,7

**Tableau I – Evolution de l'espérance de vie à la naissance depuis 1950.**

En France métropolitaine, l'espérance de vie à la naissance est de 85,7 ans pour les femmes et de 79,8 ans pour les hommes en 2019. Ces cinq dernières années, les hommes ont gagné 0,5 an d'espérance de vie et les femmes 0,2 an. Source : D'après l'INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil.

Sexe/ Années	1950	1955	1960	1965	1970	1975	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2019
<b>Hommes</b>	12,2	12,3	12,6	12,6	13,0	13,2	13,9	14,5	15,6	16,1	16,7	17,7	18,6	19,1	19,6
<b>Femmes</b>	14,6	15,1	15,6	16,1	16,8	17,2	18,2	18,8	19,9	20,6	21,2	22,0	22,7	23,0	23,5

**Tableau II – Evolution de l’espérance de vie à 65 ans depuis 1950.**

Au cours du siècle précédent, l’espérance de vie, à un âge donné, chez les personnes âgées n’a pas cessé de croître. Au 1<sup>er</sup> Janvier 2019, l’espérance de vie à 65 ans en France métropolitaine était de 19,6 ans pour les hommes et de 23,5 ans pour les femmes en France métropolitaine. Source : D’après l’INSEE, Estimations de population et statistiques de l’état civil.

Années	Proportion en % des				
	0 – 19 ans	20 – 59 ans	60 – 64 ans	65 – 74 ans	75 ans et +
<b>2013</b>	24,6	51,6	6,3	8,5	9,0
<b>2020</b>	24,4	49,4	6,1	10,8	9,3
<b>2025</b>	23,7	48,3	6,2	11,0	10,8
<b>2030</b>	23,0	47,4	6,2	11,2	12,2
<b>2035</b>	22,4	46,5	6,2	11,4	13,5
<b>2040</b>	22,3	46,1	5,6	11,5	14,6
<b>2050</b>	22,3	44,9	5,7	10,8	16,4
<b>2060</b>	21,7	44,9	5,5	10,7	17,2
<b>2070</b>	21,3	44,2	5,8	10,8	17,9

**Tableau III – Population par grand groupe d’âge de 2013 à 2070.**

Champ : France métropolitaine. Source : D’après l’INSEE, Estimations de population et statistiques de l’état civil.

Années	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2008	2020	2030	2040	2050	2070
<b>Nombre de centenaires</b>	200	977	1 122	1 545	3 760	8 063	14 504	20 944	54 255	73 106	140 791	249 000

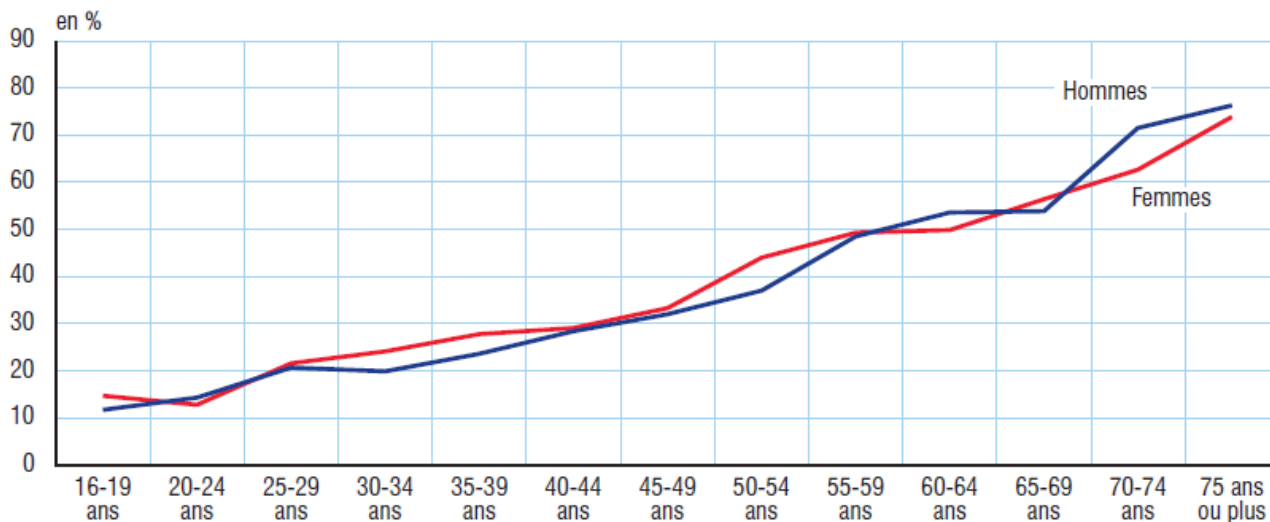
**Tableau IV – Evolution et projection du nombre de centenaires depuis 1950.**

Le nombre de centenaires a considérablement augmenté en un demi-siècle et ne cessera de croître. Au 1<sup>er</sup> Janvier 2020, la France métropolitaine dénombre 20 944 centenaires et atteindra 198 645 en 2060, soit une augmentation d’environ 89,5%. Source : D’après l’INSEE, Estimations de population et statistiques de l’état civil.

Ces chiffres décrivent une évolution qui se traduit dans les faits par un gain de vie considérable. On peut considérer comme l’une des principales réalisations de notre civilisation que l’espérance de la vie humaine



a augmenté de 2,5 ans par décennie de manière linéaire à partir du milieu du XXe siècle (Tabl. I) (1). Cette tendance croissante dans l'espérance de vie reflète d'une amélioration de la santé et des conditions socio-économiques. Elle est due à un meilleur mode de vie et de meilleurs soins médicaux, dont l'amélioration de la qualité de l'eau et des aliments et la prévention à de nombreuses maladies infectieuses. Notamment, l'amélioration des soins médicaux a joué un rôle important. En effet, la médecine moderne s'inscrit comme l'un des facteurs-clés vecteur de cette longévité exceptionnelle, passant d'environ 65 ans au début des années 1950 à plus de 85 à l'heure actuelle (Tabl. I). Cependant, la proportion croissante de personnes âgées dans notre société soulève des problèmes qui proviennent de la nature du vieillissement, c'est-à-dire du déclin fonctionnel de la santé des personnes âgées. Alors que les Français vivent plus longtemps, ce gain d'espérance de vie ne se convertit pas systématiquement en qualité de vie. Celle-ci se dégrade plus rapidement avec l'âge. Cependant en parallèle, il est frappant de constater que cette même population vit moins longtemps en bonne santé. En effet, le vieillissement est le principal facteur de risque des principales maladies chroniques et potentiellement meurtrières telles que les maladies métaboliques, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, et le cancer (2), dont la prévalence de ces maladies augmente exponentiellement avec l'âge. Ainsi, près de 40% des personnes âgées de 16 ans ou plus déclarent avoir au moins une maladie ou un problème de santé chronique (ou durable) en 2017 (selon l'INSEE). Les femmes se disent un peu plus fréquemment concernées (41%) que les hommes (39%) (selon l'INSEE). La part des individus qui déclarent une maladie ou un problème de santé chronique progresse de manière continue avec l'âge, avec des hausses particulièrement fortes entre 50 et 59 ans et après 70 ans (Fig. 2) (selon l'INSEE). Ainsi, 14,7% des femmes et 11,7% des hommes âgés de 16 à 19 ans déclarent avoir une maladie ou un problème de santé chronique, près de la moitié des 55 - 59 ans et plus de 70% des femmes et des hommes âgés de 75 ans ou plus (Fig. 2) (selon l'INSEE). Dans le monde entier, on s'attend à une augmentation spectaculaire du nombre de personnes présentant des signes d'altération de la mémoire associés à la maladie d'Alzheimer ou d'autres formes de démence sénile. En effet, l'OMS estime que 25 à 30% des personnes âgées de 85 ans et plus sont atteints d'une certaine forme de déclin cognitif. Ceci a ouvert la voie à de nombreuses recherches dans le domaine de la vieillesse notamment en termes de compréhension globale des mécanismes du vieillissement. Comprendre les facteurs qui contrôlent le vieillissement pourrait permettre d'appréhender les maladies liées à l'âge sous un autre angle et de soigner non pas les symptômes de ces maladies mais leur cause principale : le vieillissement. Étant donné que la prise en charge des personnes âgées malades représente un fardeau social et économique important pour la société, il est devenu urgent de trouver des moyens de maintenir les personnes en bonne santé plus longtemps. Ce mouvement de lutte contre le vieillissement et ses effets est devenu emblématique d'un mouvement sociétal connu sous le nom du « bien vieillir ».



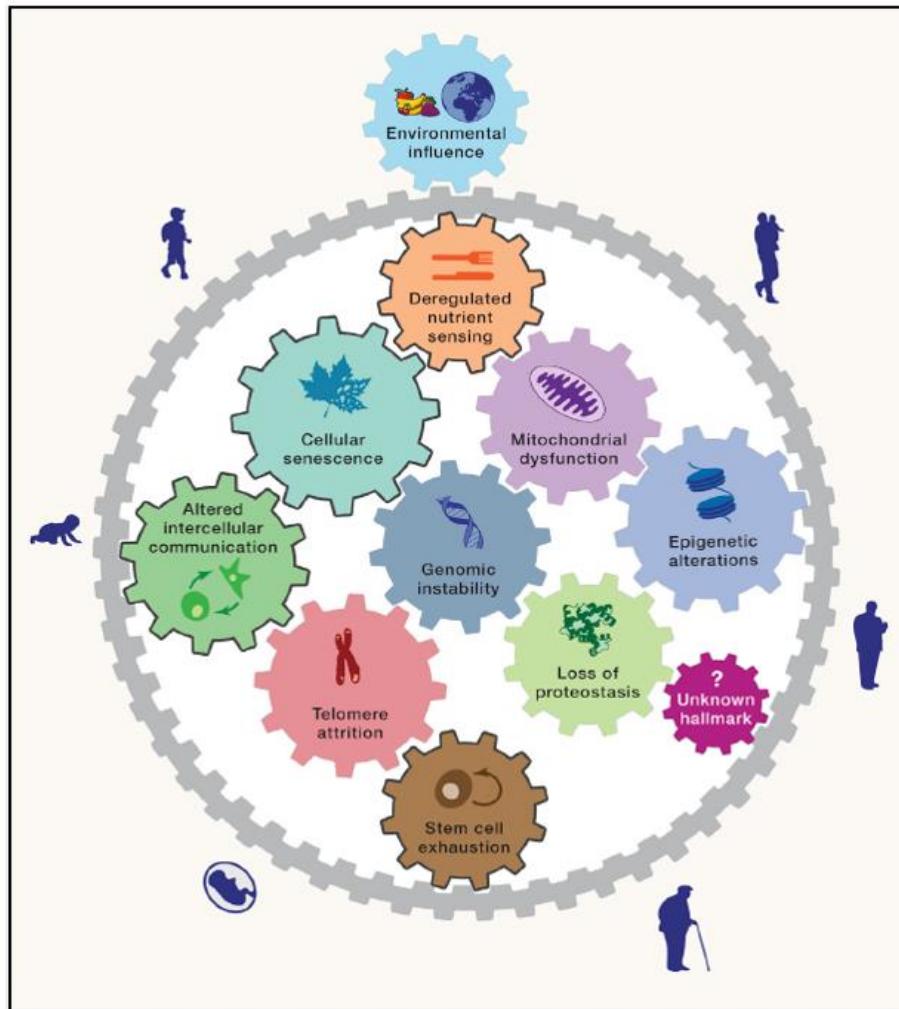
**Figure 2 – Part des personnes déclarant une maladie ou un problème de santé chronique ou durable selon le sexe et l'âge en 2017.**

Champ : France métropolitaine, personnes âgées de 16 ans ou plus résidant en ménages ordinaires. Source : D'après l'INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil.

## 1.2. Causes de la détérioration physiologique associée à l'âge.

Par définition, le vieillissement est un processus physiologique d'une extrême complexité, dont la compréhension des mécanismes est devenue un phénomène d'actualité avec l'accroissement de la durée de vie de la population. Les théories du vieillissement sont multiples et le mécanisme multifactoriel. Jusqu'ici, aucun organisme ne savait clairement comment le processus de vieillissement commençait et quels étaient les nombreux phénotypes du vieillissement qui seraient à l'origine des différents aspects du déclin fonctionnel et du risque de développer des maladies liées au vieillissement. Les nombreuses caractéristiques apparentes à ce jour étaient des effets de spectateur avec peu d'importance fonctionnelle, comme le grisonnement des cheveux ou l'apparition des rides. Cependant, de nouvelles caractéristiques du vieillissement ont récemment été identifiées et catégorisées grâce à la pluralité des modèles d'études associés à l'utilisation de techniques variées (3). En effet, neuf caractéristiques cellulaires et moléculaires ont été reconnues comme contribuant au processus de vieillissement et comme étant largement répandues dans différents organismes, avec des preuves expérimentales disponibles pour indiquer que leur apparition contribue à la progression du déclin fonctionnel lié au vieillissement (3). Les caractéristiques courantes du vieillissement comprennent l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de protéostase, la dérégulation des senseurs nutritifs, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire (Fig. 3) (3). Ces caractéristiques varient en importance entre les différents tissus et sont présentes à des degrés différents dans différents organismes.

De plus, il a été montré que ces caractéristiques sont interconnectées. Les auteurs les ont regroupées en trois catégories hiérarchiques : les caractéristiques principales, les caractéristiques antagonistes et les caractéristiques intégratives (Fig. 8) (3). En tant que première catégorie, les principales caractéristiques du vieillissement ont des effets négatifs sans équivoque sur la fonction cellulaire normale et sont considérées comme les principales causes des dommages moléculaires qui sous-tendent le vieillissement (3). Ces caractéristiques sont l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques et la perte de la protéostasie (Fig. 8) (3). Les dommages accumulés par ces processus déclenchent des réponses compensatoires représentant la deuxième catégorie, les caractéristiques antagonistes du vieillissement, qui regroupe la dérégulation des senseurs nutritifs, le dysfonctionnement mitochondrial et la sénescence cellulaire (Fig. 8) (3). Contrairement aux caractéristiques primaires, celles-ci ont des effets opposés selon leur intensité (3). À faible niveau, ils ont des effets bénéfiques, mais à haut niveau, ils deviennent délétères. Ces caractéristiques peuvent être considérées comme destinées à protéger l'organisme contre les dommages ou la pénurie de nutriments, mais lorsqu'ils sont chroniques, ils pervertissent leur but et génèrent d'autres dommages (3). C'est le cas de la sénescence cellulaire qui, à faible niveau, peut protéger l'organisme contre le cancer en bloquant la prolifération des cellules endommagées et potentiellement oncogènes, mais qui, en excès, peut favoriser le vieillissement (3). De même, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) sont des médiateurs de la signalisation et de la survie des cellules mais, à des niveaux élevés chroniques, ils peuvent produire des dommages cellulaires (3). En fin de compte, les dommages progressivement accumulés par les caractéristiques primaires et antagonistes donnent lieu à une troisième catégorie, les caractéristiques dites intégratives (3). Elle comprend l'épuisement des cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire, qui affectent directement l'homéostasie et la fonction des tissus (Fig. 8) (3). Ainsi, le vieillissement résulterait d'une combinaison de ces mécanismes, et que tous ces dénominateurs du vieillissement sont interconnectés (3).



**Figure 3 – Vue d’ensemble des caractéristiques du phénotype de vieillissement.**

De nombreuses interactions moléculaires régissent les changements du vieillissement, qui ont été regroupées en neuf signes distinctifs. Ces caractéristiques sont : l’instabilité génomique, l’attrition des télomères, l’altération épigénétique, la perte de la protéostasie, la dérégulation des senseurs nutritifs, les dysfonctions mitochondriales, la sénescence cellulaire, l’épuisement des cellules souches et l’altération de la communication intercellulaire. Source : Prise de (3).

### 1.2.1. L’instabilité génomique.

Il existe de nombreuses preuves que des changements irréversibles au sein du génome affectent négativement le vieillissement et que leur induction artificielle peut provoquer certains aspects du vieillissement accéléré (4). Il a été constaté que les lésions au niveau de l’ADN s’accumulent tout au long de la vie, car de nombreux facteurs menacent perpétuellement la stabilité et l’intégrité du génome. Ils comprennent des causes extrinsèques physiques (ex : rayonnements ultraviolets et radiations ionisantes), chimiques (ex : production d’espèces chimiques réactives et d’agents alkylants), des agents biologiques (ex : virus), ainsi que des menaces endogènes (ex : erreurs de réplication, réactions hydrolytiques spontanées et les ERO) (Fig. 4A) (4). Les lésions génétiques résultant de dommages extrinsèques ou intrinsèques sont très diverses et comprennent des mutations ponctuelles, des translocations, des gains et des pertes chromosomiques, un raccourcissement des

télomères et une perturbation génétique causée par l'intégration de virus ou de transposons (Fig. 4A) (4). Toutes ces formes d'altérations de l'ADN peuvent à terme endommager des gènes essentiels ou des voies de transcription (Fig. 8) (3) (4) (5). Par conséquent, le dysfonctionnement cellulaire pourrait compromettre l'homéostasie tissulaire ou organismique, s'il n'est pas éradiqué par l'apoptose ou la sénescence (3) (4) (5). Cela est particulièrement intéressant lorsque les dommages causés à l'ADN ont une incidence sur la fonction des cellules souches, compromettant ainsi leur rôle dans le renouvellement des tissus (6). En outre, l'implication des mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le processus de vieillissement a aussi été prouvée : une détérioration de l'ADNmt via des mutations ponctuelles aléatoires et des délétions ou une défection de l'ADN polymérase mitochondrial peuvent engendrer un vieillissement prématuré et une réduction de la durée de vie (7). En effet, l'ADNmt est considéré comme une cible majeure pour les mutations somatiques associées au vieillissement en raison du microenvironnement oxydatif des mitochondries, du manque d'histones protectrices dans l'ADNmt et de l'efficacité limitée des mécanismes de réparation de l'ADNmt par rapport à ceux de l'ADN nucléaire (ADNn) (7).

Pour minimiser ces lésions, les organismes ont développé un réseau complexe de mécanismes de réparation de l'ADN (ex : réparation par excision de base, recombinaison homologue, etc...) qui sont collectivement capables de traiter la plupart des dommages infligés à l'ADNn (Fig. 4A) (3) (4). Les systèmes de stabilité génomique comprennent également des mécanismes spécifiques permettant de garantir l'intégrité de l'ADNmt (3) (4). De récentes études génétiques suggèrent que les méthodes de réparation de l'ADNn pourraient jouer un rôle fondamental dans le processus de vieillissement. En effet, des travaux ont montré que des défaillances dans les mécanismes de réparation de l'ADN accélèrent le vieillissement chez les souris et les humains, suggérant ainsi des liens de causalité entre une accumulation des lésions au niveau de l'ADNn et le vieillissement (3) (4). Plus concrètement, prenons l'exemple de la maladie génétique du syndrome de Werner. Ici, c'est la partie de l'ADN qui code pour l'hélicase, une protéine importante impliquée notamment dans la réparation de l'ADN, qui est mutée (8). La conséquence directe est un vieillissement accéléré du corps, entraînant une probabilité très élevée de développer un cancer (8). L'espérance de vie ne dépasse que rarement 60 ans (8). Cependant, le renforcement artificiel des mécanismes de réparation de l'ADN peut retarder le vieillissement et prolonger la durée de vie des mammifères (Fig. 4A) (3).

### **1.2.2. L'usure des télomères.**

La détérioration de l'ADN affecte le génome de façon presque aléatoire. Cependant, certaines régions chromosomiques, comme les télomères, sont particulièrement sensibles aux lésions associées au vieillissement (Fig. 4A) (3). Les ADN polymérases répliquatives sont incapables de recopier soigneusement les extrémités terminales de la structure moléculaire de l'ADN. Cette fonction est exclusivement effectuée par une ADN polymérase spéciale connue sous le nom de télomérase afin que l'information génétique ne soit pas perdue par

cette limitation du système de réplication (9). Chez l'être humain, les télomérases sont uniquement exprimées dans les cellules souches embryonnaires, dans quelques cellules souches adultes et dans les cellules tumorales (9). La majeure partie des cellules somatiques (différenciées) de mammifères n'expriment pas de télomérase (9). A chaque division, cela conduit à une usure progressive des télomères aux extrémités des chromosomes. Le but de cette dégradation est de fournir une « horloge mitotique » aux cellules. Au bout d'un certain nombre de cycles cellulaires effectués par la cellule, les télomères sont tellement raccourcis qu'il y a un risque de perte de l'information génétique présente juste avant (9). La cellule entre alors en crise télomérique et où la seule issue possible est que cette dernière entre en sénescence, ce qui bloquera définitivement sa capacité à proliférer (9) (10). Ce phénomène est en théorie une bonne chose, puisqu'il « force » les cellules, qui se sont déjà beaucoup divisées, celles qui ont le plus de chance d'avoir ainsi leur ADN dégradé, à entrer en sénescence puis à mourir par apoptose. Il s'agit notamment de réduire la probabilité de développer un cancer, soit une division incontrôlée de cellules (9).

De nombreuses études ont notamment montré que le vieillissement normal, tant chez l'homme que la souris, s'accompagne d'une attrition des télomères (Fig. 4A) (3) (9). Cependant, ce phénomène pose problème s'il apparaît trop tôt car cela peut notamment épuiser les réserves des cellules souches, les forçant trop tôt à se différencier et donc à entrer en sénescence. En effet, si des protéines impliquées dans la protection (telle la shelterine) ou la réparation (telle la télomérase) du télomère sont détériorées, ou inexistantes suite aux dommages de l'ADN, les cellules atteintes deviendront plus rapidement sénescents, c'est-à-dire enclinent à mal fonctionner et à déclencher des maladies (9). Comme évoqué précédemment, plusieurs mécanismes interviennent dans la régulation de la reproduction des télomères, tels que le complexe multiprotéique shelterine qui fixe les télomères (11). L'une des principales fonctions de ce complexe est de protéger les télomères des mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que de réguler l'activité de la télomérase (11). Sinon, les télomères seraient "réparés" au fur et à mesure que l'ADN se brise, entraînant des fusions chromosomiques (11). Un défaut de fonctionnement dans les composants de la shelterine entraîne un déclin rapide de la capacité régénératrice des tissus et un vieillissement accéléré (11). De plus, une déficience en télomérase chez l'homme est associée au développement prématuré de maladies, telles que la fibrose pulmonaire, la dyskératose congénitale et l'anémie aplastique, qui implique la perte de la capacité régénératrice de différents tissus (9). Des liens de cause à effet entre la perte de télomères, la sénescence cellulaire et le vieillissement de l'organisme ont ainsi été établis. Les souris ayant des télomères raccourcis ou allongés présentent respectivement une diminution ou une augmentation de leur durée de vie (3) (12). Des preuves récentes indiquent également que le vieillissement peut être inversé par la réactivation génétique de la télomérase chez des souris âgées (13). En outre, le vieillissement physiologique normal peut être retardé sans augmenter l'incidence du cancer chez les souris adultes de type sauvage par la transduction virale systémique de la télomérase (12).

### 1.2.3. L'altération épigénétique.

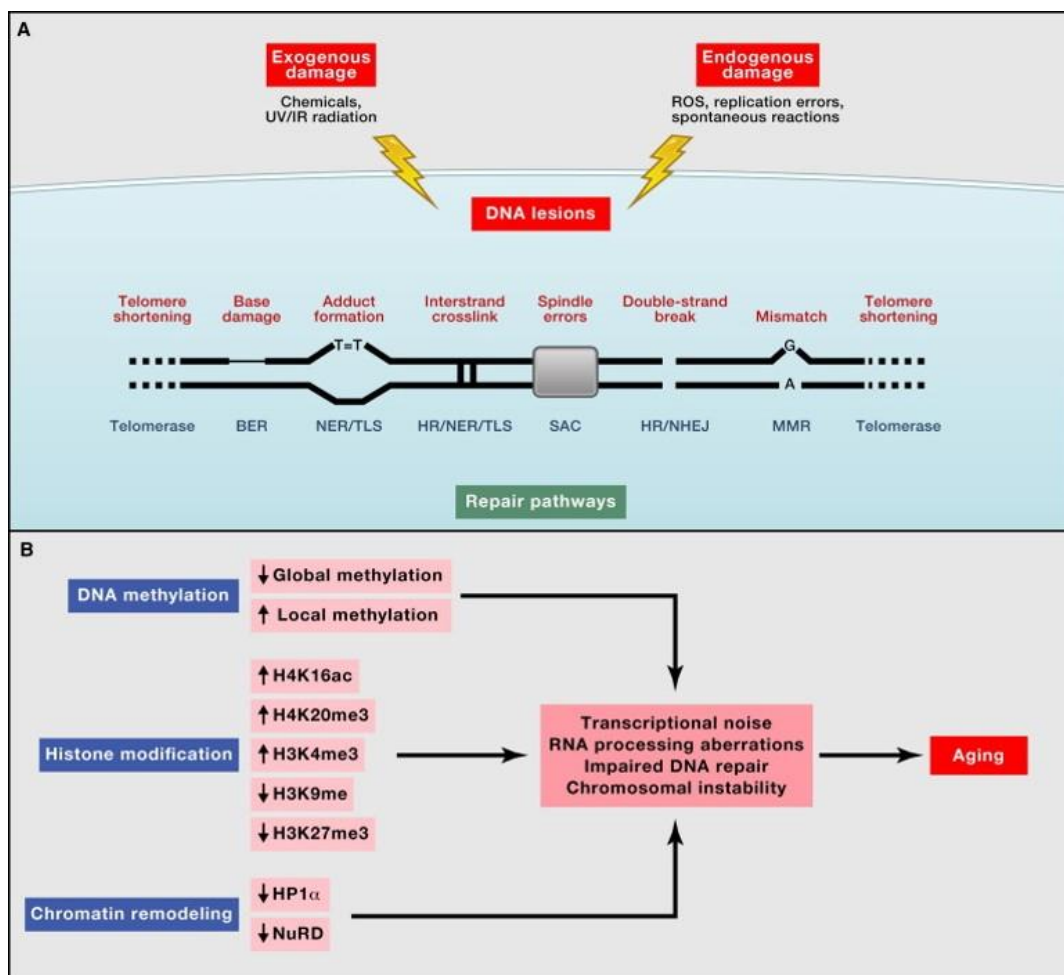
L'ADN est une molécule incroyablement longue avec plus de 3 milliards de bases réparties sur 22 chromosomes. Pour que celui-ci tienne à l'intérieur des cellules, il est intensément compacté. L'ADN s'enroule notamment autour d'histones, des protéines de structures permettant de condenser ou décondenser la chromatine. Ces structures sont très dynamiques, de manière à ce que si la cellule a besoin d'accéder à des gènes spécifiques sur une partie de l'ADN qui est enroulée autour d'une histone, ce dernier peut rapidement se déplacer pour rendre l'ADN accessible. Cette dynamique de la condensation de l'ADN, pour le rendre plus ou moins accessible et facile à lire, est appelée l'épigénétique. Il désigne les nombreux mécanismes, comme la méthylation ou l'acétylation, qui vont modifier/remodeler constamment l'état de la chromatine, permettant ainsi de moduler l'expression des gènes sans changer la séquence (Fig. 4B) (3).

De nombreuses études ont démontré que l'épigénétique est au cœur du processus du vieillissement car elle décrit des changements d'activité cellulaire dans le temps via une modulation des voies traductionnelles (3) (5). Effectivement, lorsque les systèmes enzymatiques impliqués dans ces mécanismes, qui garantissent l'entretien et l'évolution des configurations épigénétiques, sont détériorés voire inexistant suite aux dommages de l'ADN, le remodelage de l'ADN devient très instable, désorganisé et du "bruit" transcriptionnel apparaît, soit une accumulation "d'erreurs de copie" qui altère les mécanismes en cours (3) (14). De ce fait, les parties très importantes de l'ADN peuvent ainsi demeurer souvent « cachées » par les histones, ou inversement avec des parties de l'ADN qui code pour des fonctions délétères pour la cellule. Dans ce cas, certaines fonctions des cellules, comme la production d'énergie ou le recyclage des déchets, sont altérées (3) (14). Contrairement aux mutations sur l'ADN, les altérations épigénétiques sont théoriquement réversibles. En effet, les changements épigénétiques sont introduits par des enzymes et leurs actions sont modulables (3) (14). De plus, les voies de signalisation régulant ces enzymes peuvent être ciblées par des médicaments (3) (14). Enfin, des changements du comportement et du mode de vie peuvent aussi modifier les altérations épigénétiques (3) (14).

Au cours du vieillissement, les histones subissent, tout comme l'ADN, des changements épigénétiques (3) (14). Les modifications qui les affectent sont principalement des méthylations (ajout d'un groupement chimique méthyle  $-CH_3$  à une base cytosine) et des acétylations (ajout d'un groupement chimique acétyle  $-COCH_3$ ) (3) (14). Des aberrations de méthylation entraîneraient une augmentation des récurrences de cancer et un faible taux de survie (14). Avec l'âge, les changements de méthylation sont accompagnés par une perte globale du niveau d'acétylation de certaines histones (processus appelé hypoacétylation) (14). Des études menées chez la souris ont montré qu'empêcher l'hypoacétylation liée à l'âge permettait de prévenir les troubles cognitifs et de réduire la sévérité de pathologies telles que la maladie de Parkinson, l'ostéoporose et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (14). De plus, la suppression de certains composants des complexes de méthylation de l'histone augmente la durée de vie chez les invertébrés (15) (16). Par exemple, l'inhibition de l'histone déméthylase chez les vers pourrait augmenter la durée de vie en ciblant les voies clés de la longévité (15). Les

sirtuines SIRT-1, 6 et 7 jouent un rôle clé dans les modifications des histones. Chez les mammifères, les vertus de la surexpression de la SIRT-1 comprennent une stabilité génomique améliorée (17). La SIRT-6 régule la stabilité génomique, les signaux NF- $\kappa$ B et l'homéostasie du glucose via la désacétylation de l'histone (18) (19).

Pour maintenir l'architecture chromatinienne, des protéines chromosomales comme HP1 $\alpha$  (Heterochromatin protein 1 $\alpha$ ) et des facteurs de remodelage chromatinien tels que les protéines Polycomb et le complexe NuRD (Nucleosome-Remodeling and Histone Deacetylase chromatin-remodeling complexes) sont indispensables (20). Avec l'âge, le niveau de ces protéines baisse et induit une perte ou une redistribution globale de l'hétérochromatine, établie comme étant une caractéristique du vieillissement, pouvant entraîner une instabilité génomique accrue ainsi qu'une dérégulation transcriptionnelle (Fig. 4B) (20). Un tel phénomène se retrouve chez les personnes atteintes des syndromes de vieillissement prématuré, comme la maladie de Werner et la maladie de Huntchinson-Gilford (20). Des études ont découvert la preuve d'un lien entre la formation d'hétérochromatine et une stabilité chromosomique (20) (21). En effet, des mouches présentant des mutations de perte de fonction dans HP1 $\alpha$  ont une réduction spectaculaire de la durée de vie et un taux réduit d'hétérochromatine, alors que la surexpression de cette protéine prolonge la longévité chez les mouches et retarde la détérioration musculaire caractéristique de la vieillesse (21).



**Figure 4 – Instabilité génomique, rétrécissement des télomères et altérations épigénétiques.**

(A) Les agents endogènes ou exogènes peuvent engendrer l'apparition d'une variété d'altérations génomiques sur l'ADN nucléaire ou mitochondrial qui sont représentées schématiquement sur un seul chromosome. Ces lésions peuvent être



réparées par divers mécanismes. Des lésions excessives à l'ADN ou une réparation insuffisante de l'ADN favorisent le processus de vieillissement. **BER** : réparation par excision de base ; **HR** : réparation par recombinaison homologue ; **NER** : réparation par excision des nucléotides ; **NHEJ** : jonction d'extrémités non-homologues ; **MMR** : réparation des mésappariements ; **ROS** : espèces réactives de l'oxygène ; **TLS** : translesion synthesis ; **SAC** : spindle assembly checkpoint. **(B)** Des altérations dans la méthylation de l'ADN ou dans l'acétylation et la méthylation des histones, ainsi que d'autres protéines associées à la chromatine, peuvent induire des changements épigénétiques qui contribuent au processus de vieillissement. **ac** : acétylation ; **HP1 $\alpha$**  : Heterochromatin protein 1 $\alpha$  ; **me** : méthylation ; **NuRD** : Nucleosome-Remodeling and Histone Deacetylase chromatin-remodeling complexes. Source : Prise de (3).

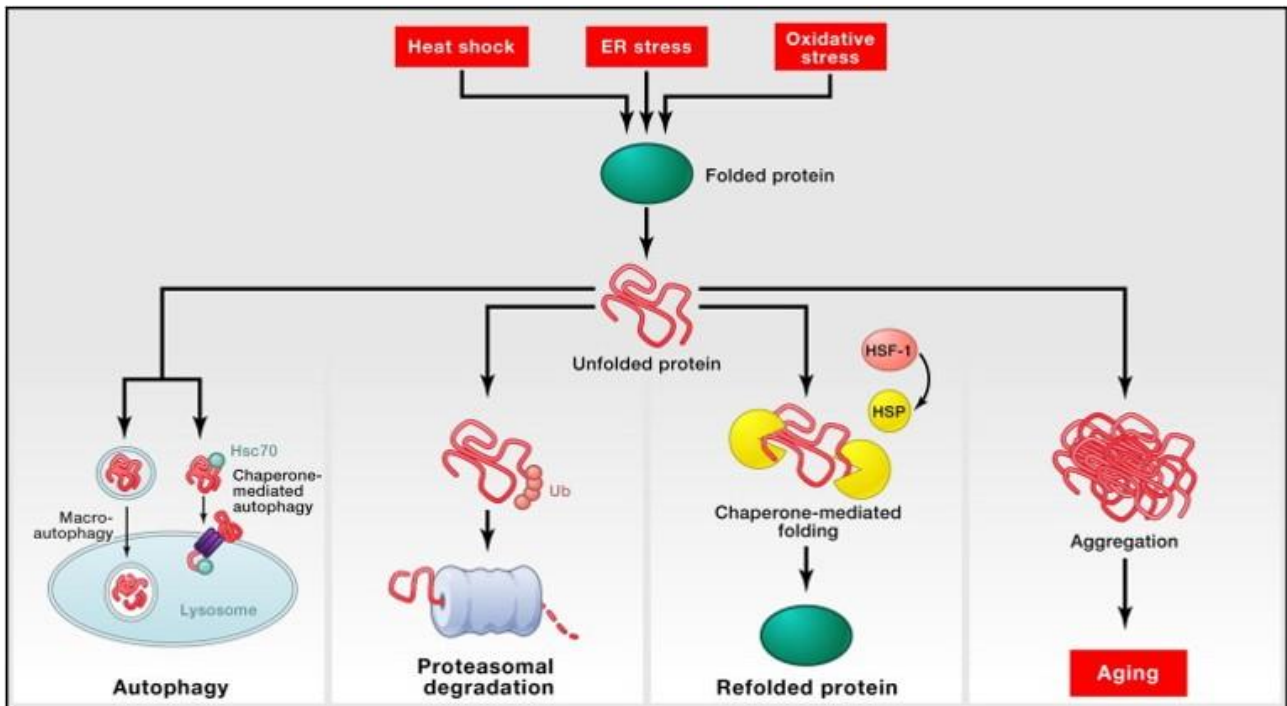
#### 1.2.4. Détérioration de la réponse aux protéines dépliées.

Choc thermique, stress, molécules oxygénées réactives, voici autant de causes à la fois endogènes et exogènes qui peuvent dégrader les moteurs moléculaires, les protéines (Fig. 5 et 8) (22) (23). En présence de ces facteurs, les protéines se voient ainsi déformées, mal repliées, provoquant ainsi un dysfonctionnement cellulaire (Fig. 5 et 8) (22) (23). En temps normal, les cellules disposent d'une série de systèmes de recyclage, telles que l'autophagosome ou le protéasome, et qui forment ce que l'on appelle la protéostasie (Fig. 5 et 8) (22) (23). En réponse à ces stress, ces mécanismes sont adaptés pour préserver le fonctionnement du protéome. En revanche, de plus en plus d'études ont montré que l'activité de ces systèmes protéolytiques décline au cours du vieillissement (22) (23). Or, si ces voies ne fonctionnent plus à pleine puissance, si les protéines impliquées dans ces mécanismes sont détériorées voire inexistantes à la suite de dommages causés à l'ADN, on peut observer des agrégations de protéines endommagées (Fig. 5) (22) (23). À un niveau macroscopique, ces agrégations peuvent déclencher des maladies bien connues, telle que la cataracte (agrégations dans le cristallin de l'oeil, qui perd ainsi de sa transparence) ou encore la maladie d'Alzheimer (agrégations de protéines Tau et de plaques  $\alpha$ - $\beta$  autour des neurones) (23).

Les protéines chaperonnes jouent un rôle majeur dans le pliage, l'assemblage, le transport et le ciblage par dégradation des protéines. Or, leur synthèse est considérablement altérée avec l'âge et ces changements peuvent remettre en cause leur activité, entraînant ainsi des problèmes dans le contrôle de qualité des protéines (24). En effet, les souris mutantes déficientes en protéines chaperonnes présentent des phénotypes de vieillissement accéléré, alors que les souris à longue durée de vie présentent une nette augmentation de certaines protéines de choc thermique (25). De même, les vers et les mouches transgéniques surexprimant des protéines chaperonnes ont une longue durée de vie (26) (27). En outre, plusieurs approches pour maintenir ou améliorer la protéostasie visant à activer le repliement et la stabilité des protéines par l'intermédiaire de chaperons sont mises en place. Par exemple, l'induction pharmacologique de la protéine de choc thermique Hsp72 permet de préserver la fonction musculaire et retarder la progression de la pathologie dystrophique chez des modèles murins présentant une dystrophie musculaire (28).

D'autres systèmes intracellulaires interviennent également pour éliminer les agrégats protéiques dans les cellules. L'autophagie est un des mécanismes biologiques qui nettoie les cellules des protéines et des organites non-fonctionnels (29). Cependant, un certain nombre d'études a montré que l'activité de ce système se détériore avec l'âge (29). Apparemment, stimuler l'autophagie permettrait d'ouvrir une voie vers la longévité en bonne santé (29). En effet, des manipulations pharmacologiques et génétiques qui augmentent la durée de vie chez des organismes modèles peuvent stimuler l'autophagie (29). Par exemple, l'administration de rapamycine (un inhibiteur de mTOR) peut retarder de multiples aspects du vieillissement et augmenter la durée de vie moyenne des souris. Ces effets dépendent strictement de l'induction de l'autophagie, notamment par l'inhibition de la protéine ribosomique S6 kinase 1 (S6K1) impliquée dans la synthèse des protéines (29) (30). De même, la spermidine, un autre inducteur de la macroautophagie, favorise également la longévité chez divers organismes modèles par l'induction de l'autophagie (29) (31). Il s'agit ici d'une démonstration puissante que le vieillissement est un facteur quasi-exclusif dans le développement de pathologies liées à l'âge suite à une perturbation de la protéostasie. En outre, il existe des exemples remarquables de manipulations génétiques et pharmacologiques qui améliorent la protéostasie et retardent le vieillissement chez les mammifères.

L'entretien de la protéose des mitochondries est un autre véritable défi en raison des niveaux d'ERO dans cet organite. La façon la plus commune d'éliminer les mitochondries défectueuses pourrait être la dégradation autophagique, connue sous le nom de mitophagie (32). Cependant, de nombreuses études ont mentionné un dysfonctionnement du nettoyage des mitochondries et des troubles liés au vieillissement (Fig. 8) (32). Lors de divers types de stress mitochondrial, déclenchés génétiquement ou pharmacologiquement, le dysfonctionnement du protéome est détecté et communiqué au noyau, où un programme de transcription étendu, visant à réparer les dommages, est activé (33) (34). En effet, des études indiquent que la communication entre les mitochondries et le noyau peuvent provoquer l'expression de gènes nucléaires qui encodent les protéines mitochondriales en réponse aux protéostases altérées. La réponse mitochondriale des protéines dépliées (UPR<sup>mt</sup>), une réaction adaptative initiée par l'accumulation de protéines aberrantes dans la matrice mitochondriale ou par une communication mitonucléaire déséquilibrée, s'active, synchronise l'activité des génomes mitochondriaux et nucléaires et assure ainsi une qualité et une fonction optimale du protéome mitochondrial (32) (33). De ce fait, des échecs de communication entre les mitochondries et le noyau pourraient par conséquent être impliqués dans l'affaiblissement de la protéostasie mitochondriale (33) (34).



**Figure 5 – Perte de l'homéostasie des protéines.**

Des facteurs endogènes et exogènes provoquent le dépliage des protéines ou nuit au bon pliage lors de la synthèse des protéines. Les protéines dépliées sont généralement repliées par des protéines de choc thermique ou sont destinées à être détruites par les voies ubiquitine-protéasome ou lysosomale (autophagie). Les voies autophagiques comprennent la reconnaissance des protéines dépliées par le chaperon Hsc70 et leur importation ultérieure dans les lysosomes (autophagie à médiation par chaperon) ou la séquestration des protéines et organites endommagés dans des autophagosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes (macroautophagie). Cependant, l'incapacité des systèmes à replier ou à dégrader les protéines non-repliées peut entraîner leur accumulation et leur agrégation dans les cellules, ce qui entraîne des effets protéotoxiques. **ER** : Réticulum endoplasmique ; **HSF-1** : Heat Shock Factor protein 1 ; **HSP** : Heat Shock Proteins ; **Hsc70 (HSPA8)** : Heat shock cognate 71 kDa protein ; **Ub** : Ubiquitine. Source : Prise de (3).

### 1.2.5. La dérégulation de la sensibilité aux nutriments.

Les différentes voies de signalisation qui détectent et réagissent aux fluctuations des niveaux de nutriments sont généralement dérégulées au cours du vieillissement et en présence de troubles métaboliques (35). Ces voies de détection de nutriments adaptent le comportement cellulaire, le métabolisme, le développement et la longévité aux niveaux de nutriments (35). Parmi elles, la voie de signalisation de l'insuline et de l'IGF-I (IIS) est impliquée dans la détection du glucose et est également liée à la longévité (Fig. 6A) (35) (36). L'hormone IGF-I est produite en réponse à l'hormone de croissance (GH). De nombreuses preuves indiquent que les diverses manipulations génétiques qui atténuent l'intensité de signalisation à certain point au sein de la voie IIS (IGF-IR, InR, PI3K ou AKT), couplée à l'activation des facteurs de transcription FOXO, ont permis d'augmenter la durée de vie des vers, des mouches et des souris (36). Par conséquent, les nématodes surexprimant le facteur de transcription *Daf-16/Foxo* avec une inhibition d'*Age-1/PI3K* ou de *Daf-2/InR* présentent une prolongation

considérable de leur durée de vie par rapport aux vers témoins (37) (38). Paradoxalement, les niveaux de GH et d'IGF-I diminuent au cours du vieillissement normal, ainsi que dans les modèles murins de vieillissement prématuré (39). Ainsi, une réduction de la voie IIS est une caractéristique commune au vieillissement physiologique et accéléré, alors qu'une baisse constitutive de la voie IIS permet aussi de prolonger la longévité. Ces observations apparemment contradictoires peuvent être interprétées comme une réaction de survie de l'organisme, qui à terme se détériore avec l'âge. En effet, une modulation négative d'IIS reflète une réponse défensive visant à minimiser la croissance et le métabolisme cellulaire, et ainsi de réduire le taux de lésions cellulaires (40). Selon ce point de vue, les organismes dont l'IIS est diminué peuvent survivre plus longtemps car ils ont des taux de croissance et de métabolisme cellulaire plus faibles et, par conséquent, des taux de dommages cellulaires plus faibles (40). Cependant, les réponses de défense contre le vieillissement peuvent avoir le risque de devenir éventuellement délétères et d'aggraver le vieillissement. Ainsi, des niveaux extrêmement faibles de signalisation d'IIS sont incompatibles avec la vie, comme l'illustrent les mutations nulles de souris dans les kinases PI3K ou AKT qui sont mortelles pour l'embryon (41). Il existe également des cas de souris progéroïdes présentant de très faibles niveaux d'IGF-I, chez lesquelles une supplémentation en IGF-I peut améliorer le vieillissement prématuré (42).

D'autres voies interconnectées de détection des nutriments comprenant les sirtuines, et les enzymes AMPK et mTOR ont également tendance à être dérégulées avec le vieillissement, mais des traitements médicamenteux réputés pour réguler leur activité semblent atténuer le vieillissement et augmenter la longévité dans divers organismes modèles (Fig. 6A) (35). La protéine mTOR détecte les concentrations élevées en acides aminés (AA). Des études ont notamment révélé que l'activité de mTOR est augmentée au cours du vieillissement, mais que son inhibition a clairement des effets bénéfiques sur le vieillissement et la longévité des organismes modèles (43). En effet une fois mTOR activée, la protéine peut activer des mécanismes tels que la prolifération cellulaire (43). Cependant dans une cellule endommagée par des dégradations au niveau du génome, augmenter la prolifération cellulaire peut facilement mener à développer une tumeur. Or, un traitement à la rapamycine (un inhibiteur chimique de mTOR) chez les mammifères permet de prolonger la longévité (44).

Les deux autres capteurs de nutriments, AMPK et sirtuines, agissent dans le sens opposé à mTOR, signifiant qu'ils signalent la rareté et le catabolisme des nutriments au lieu de leur abondance et de leur anabolisme (35). Les sirtuines décèlent des états faibles en énergie en détectant des niveaux élevés en NAD<sup>+</sup>, alors que l'AMPK décèle des niveaux d'énergie élevés en détectant des niveaux élevés d'AMP (35). Par conséquent, leur régulation positive favorise un vieillissement en bonne santé. L'activation de l'AMPK interrompt mTORC1 (45). En effet, des travaux ont montré que l'administration de metformine chez des vers et des souris peut entraîner une élongation de la durée de vie par l'intermédiaire de l'activation de l'AMPK (46). Concernant la SIRT-1, il a été montré qu'elle pouvait désacétyler et activer PGC-1 $\alpha$  (47). Ce dernier orchestre une réponse métabolique complexe qui comprend la mitochondriogenèse, des défenses antioxydantes renforcées et une meilleure oxydation des acides gras (AG), ce qui pourrait établir un lien entre la détection de nutriments et la fonction des mitochondries (47).

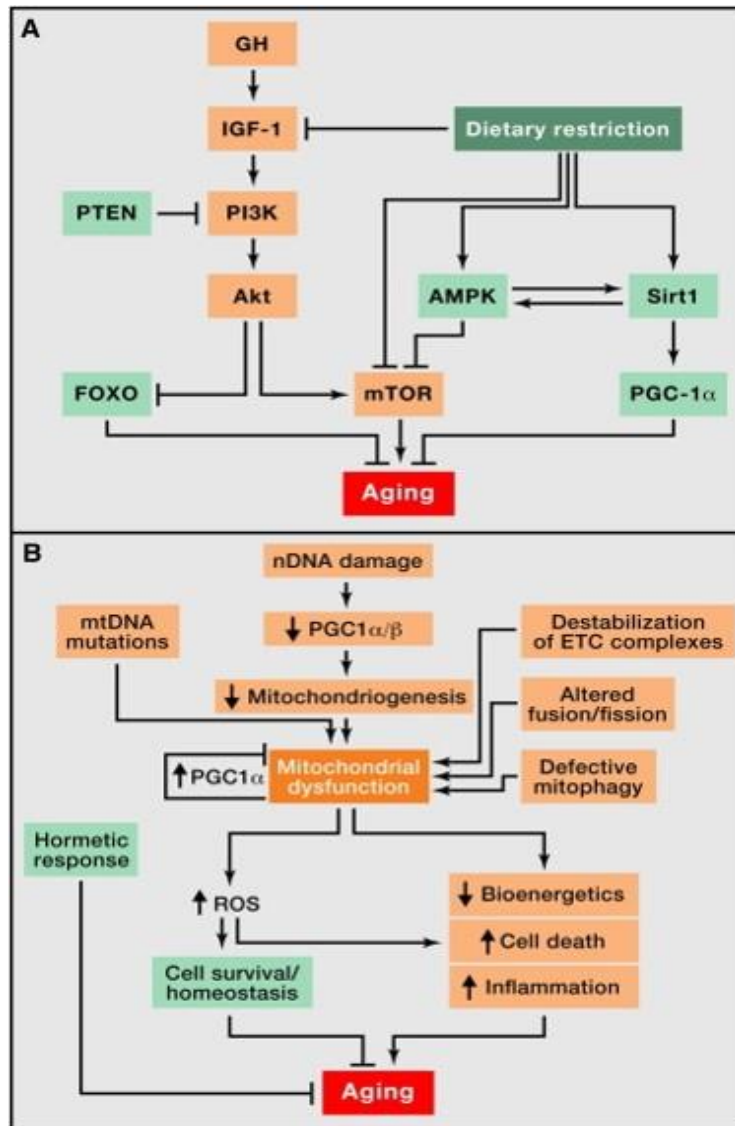
Ce n'est pas pour rien que la malnutrition est l'une des premières causes de mortalité dans le monde. S'il s'agit souvent de nutrition insuffisante dans les pays sous-développés, la malnutrition dans les pays développés se concrétise par l'ingestion trop importante de calories, causant diabète, obésité et maladies cardiovasculaires (première cause de mortalité dans les pays occidentaux). Ainsi, des voies de détection des nutriments efficaces sont nécessaires pour préserver la capacité métabolique au niveau de l'organisme et donc pour supprimer le développement de maladies associées au vieillissement.

### **1.2.6. Défaillance des mitochondries.**

Les mitochondries sont les usines énergétiques des cellules. Elles produisent notamment de l'ATP, molécule énergétique, produite à partir de réactions dont les composants principaux sont les sucres et les AG. Or, ces mécanismes de production d'énergie deviennent déficients avec l'âge. Avec le vieillissement des cellules et des organismes, l'efficacité de la chaîne respiratoire tend à diminuer, ce qui augmente la fuite d'électrons et réduit la génération d'ATP (Fig. 6B) (7). Une mitochondrie qui fonctionne mal, c'est également une sur-génération d'ERO, des sous-produits normaux du métabolisme cellulaire aérobie. La théorie populaire du stress oxydatif, autrement dite théorie des radicaux libres, propose que le dysfonctionnement mitochondrial qui se produit avec le vieillissement entraîne une production accrue de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), qui à son tour provoque une détérioration mitochondriale supplémentaire et des dommages cellulaires globaux (Fig. 6B) (48). Sous des conditions normales, les ERO sont maintenus à une concentration physiologique par un système d'enzymes antioxydantes, notamment la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) (7) (49). Il est ainsi très important pour les cellules de trouver un équilibre entre la production de molécules oxydantes et les enzymes antioxydantes. Si la balance entre ces composés est rompue, il peut se produire une accumulation de dérivés toxiques. En effet, plusieurs études soutiennent que ce déséquilibre contribuerait au processus de vieillissement et à l'incidence de certaines maladies associées au vieillissement, telles que le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires et neurodégénératives (7) (49). En effet, l'accumulation d'ERO dans la mitochondrie peut endommager des complexes enzymatiques de la chaîne de transport des électrons (ETC) et l'ADNmt (7) (49). Ces dommages vont par la suite contribuer à une augmentation de la production d'ERO et au déclin graduel des fonctions des mitochondries (7) (49). De plus, l'augmentation d'ERO intracellulaire module différents signaux qui accélèrent la mitogenèse et amènent une sénescence cellulaire prématurée (7) (49). Or, ce rôle de la contrainte oxydative dans le vieillissement a été plus tard reconsidéré avec l'apparition de nouveaux résultats (50). De récentes expériences ont montré que des niveaux élevés de DRO pouvaient prolonger la durée de vie des *C. elegans*, alors que cela n'a pas été le cas pour une défense antioxydante améliorée (51). De même, des souris avec des niveaux d'ERO mitochondriaux augmentés et des dommages oxydatifs ne présentent pas d'accélération du vieillissement (52) et les souris ayant des défenses antioxydantes accrues n'affichent pas une durée de

vie prolongée (53). Par contre, les manipulations génétiques qui altèrent la fonction mitochondriale mais n'augmentent pas les niveaux d'ERO accélèrent le vieillissement (54). Parallèlement, il a été démontré que les DRO déclenchent la prolifération et les réactions de survie dans des conditions de stress (49). En ce sens, les DRO pourraient être considérés comme un signal de survie provoqué par le stress. Lors du vieillissement, le stress cellulaire et le nombre de lésions augmentent. Les niveaux de DRO augmentent en parallèle dans le but de maintenir la survie. Par contre au-delà d'un certain seuil, ces niveaux trahissent leur devoir homéostatique initial et pourraient possiblement aggraver les dommages associés à l'âge (50).

Le dysfonctionnement progressif des mitochondries, indépendamment des ERO, semble être une caractéristique du vieillissement. Cette déficience bioénergétique des mitochondries au cours le vieillissement peut résulter de multiples mécanismes, tels que l'accumulation de délétions et de mutations dans l'ADNmt. Cependant, il a été montré que la voie métabolique de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) des mitochondries est aussi perturbée au cours de vieillissement avant toute lésion significative au niveau de l'ADNmt, ce qui suggère que les lésions aux ADNmt seules ne peuvent pas expliquer le dysfonctionnement des mitochondries (55). D'autres causes ont alors été étudiées. Une partie de cette détérioration est due à l'appauvrissement du pool de  $\text{NAD}^+$  et à l'altération fonctionnelle des sirtuines qui en résulte (Fig. 8) (55). En effet, les sirtuines se désactivent au fur à mesure que l'âge chronologique avance. Par exemple, la SIRT-1 permet notamment de moduler la biogenèse mitochondriale par un processus impliquant le coactivateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  (47) et l'élimination des mitochondries endommagées par autophagie (56). Or, une faible activité de la SIRT-1 entraînerait l'inactivation de PGC-1 $\alpha$ , MYC et HIF-1 $\alpha$  (Fig. 8) (55). Ainsi, cette modulation négative d'HIF-1 $\alpha$  entraîne une production réduite du facteur de transcription mitochondrial A (TFAM), un activateur clé de la transcription mitochondriale, alors que celle de PGC1- $\alpha$  provoque une expression limitée des gènes nucléaires codant pour les protéines mitochondriales (55). De même, la SIRT-3, qui est la principale désacétylase mitochondriale, cible de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, telles que les composants de la chaîne respiratoire, le cycle des acides tricarboxyliques, la cétogenèse et la  $\beta$ -oxydation des AG (57). La SIRT-3 peut également contrôler directement le taux de production d'ERO en désacétylant la SOD de manganèse, une enzyme antioxydante mitochondriale majeure (58). De ce fait, cette diminution de la disponibilité en  $\text{NAD}^+$  pourrait expliquer la dérégulation de l'expression des mitochondries et la perturbation de l'OXPHOS. De plus, le dysfonctionnement des mitochondries pourrait être provoqué par une altération de la communication entre le noyau et les mitochondries à travers une dérégulation de l'activité des sirtuines mitochondriales (34). Elle a de nombreux effets négatifs sur le métabolisme des cellules en raison du rôle crucial des mitochondries dans le métabolisme énergétique cellulaire. Par exemple, cela pourrait conduire à une mauvaise gestion de l'apoptose et ainsi provoquer des réactions inflammatoires (59).



**Figure 6 – Dérégulation des senseurs nutritifs et dysfonctionnement mitochondrial.**

(A) Vue d'ensemble des différentes voies de capteurs des nutriments, impliquant les voies de signalisation de l'insuline et du facteur de croissance de type insulinique (IGF-1), de mTOR, de l'AMPK et des sirtuines, et leur relation avec la restriction alimentaire et le vieillissement. Les protéines favorisant le vieillissement sont en orange, et les molécules ayant des propriétés anti-âges sont indiquées en vert. (B) La fonction mitochondriale est perturbée par les mutations de l'ADNmt associées au vieillissement, la réduction de la mitochondriogenèse, la déstabilisation des complexes de la chaîne de transport des électrons (ETC), l'altération de la dynamique mitochondriale ou un contrôle de qualité défectueux par la mitophagie. Les signaux de stress et la fonction mitochondriale défectueuse génèrent des ERO qui, en dessous d'un certain seuil, induisent des signaux de survie pour restaurer l'homéostasie cellulaire mais qui, à des niveaux plus élevés ou continus, peuvent contribuer au vieillissement. Source : Prise de (3).

### 1.2.7. La sénescence cellulaire.

Une cellule est dite sénescente lorsque cette dernière n'est plus capable de se diviser en réponse à différents facteurs de stress et comporte des changements phénotypiques notables (Fig. 7A). Cette transition

vers la sénescence s'accompagne le plus souvent d'une résistance aux signaux apoptotiques, d'une augmentation de l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase lysosomiale, de la sécrétion d'un mélange hétérogène de molécules essentiellement pro-inflammatoires appelé « senescence-messaging secretome » (SMS), ainsi que de profondes modifications cytomorphologiques (aplatissement cellulaire, vacuolisation du cytoplasme, augmentation du volume nucléaire) et des altérations majeures de l'architecture chromatinienne et de l'expression génique (60) (61). Ce mécanisme fût décrit pour la première fois dans les années 1960 lorsque HAYFLICK et MOORHEADS démontrèrent que les capacités de prolifération des fibroblastes humains *in vitro* étaient limitées (10). Au cours de leurs expérimentations, ils ont observé qu'à l'issue d'un nombre défini de divisions cellulaires, le nombre de mitoses observées déclinait pour finalement devenir nul et ce malgré l'apport en facteurs de croissance dans le milieu de culture (10). Depuis ce jour, de nombreuses études ont établi le rôle déterminant que cette destinée cellulaire joue à chaque étape de la vie, notamment sur l'embryogenèse, la remodelage tissulaire ou encore comme barrière à l'émergence de cancers en limitant la réplication des cellules pré-néoplastiques (60) (61). De plus, nous savons qu'elle peut être causée par des stimuli variés, tels que par l'érosion télomérique, l'hyperactivation d'oncogènes, le stress oxydatif, les stress génotoxiques, la perte d'un gène suppresseur de tumeur ou encore les dysfonctionnements mitochondriaux (60) (61). De ce fait, les cellules qui entrent en sénescence arrêtent de proliférer avant que les instabilités chromosomiques liées au raccourcissement des télomères, par exemple, aient un effet favorable sur la tumorigenèse. La sénescence empêche donc la propagation des cellules endommagées, et potentiellement oncogènes, et déclenche leur disparition par le système immunitaire (60) (61).

En vieillissant, les cellules tendent à accumuler différents dommages cellulaires et génétiques, elles sont donc plus susceptibles d'entrer en sénescence (Fig. 7A). D'ailleurs de nombreuses études rapportent une augmentation du nombre de cellules sénescents avec le vieillissement chronique dans divers tissus et organes chez les mammifères, suggérant un lien de causalité entre sénescence cellulaire, vieillissement et pathologies associées (60) (61). Historiquement, ce lien fût pour la première fois soulevé à l'issue d'une étude *in vivo*, et focalisé sur l'étude d'un modèle murin progéroïde (c'est-à-dire qui présente un vieillissement accéléré) sous-exprimant la kinase BUB1B, normalement impliquée dans le contrôle de la ségrégation chromosomique (62). Ces souris développaient de manière extrêmement précoce de multiples troubles liés à l'âge, tels que la cachexie (amaigrissement important), la sarcopénie (diminution des capacités musculaires), la cataracte (opacification du cristallin), la gliose cérébrale (prolifération des cellules gliales) ou encore la perte d'élasticité des parois artérielles (62). Au travers de manipulations génétiques visant à induire l'apoptose spécifique des cellules sénescents chez ces souris (modèle murin INK/ATTAC), l'équipe de VAN DEURSEN mettait alors en évidence un retard important dans l'émergence de ces divers troubles, sans pour autant que la durée de vie de ces souris ne soit allongée. Quelques années plus tard, cette même équipe a démontré que l'élimination spécifique des cellules sénescents sur un modèle INK/ATTAC non-progéroïde permettait d'atténuer la détérioration de plusieurs organes et tissus liée à l'âge, accompagnée d'une augmentation significative de la durée de vie des souris, soulignant cette fois-ci l'impact de la sénescence sur l'espérance de vie (63).



Qu'elle soit initiée par le rétrécissement télomérique ou une détection excessive des oncogènes, l'établissement de la sénescence cellulaire repose sur l'activation de deux voies essentielles : p19<sup>ARF</sup>/p53 et pRB/p16<sup>INK4a</sup> (Fig. 8) (60) (61). Ces suppresseurs de tumeurs sont connus pour leur rôle déterminant dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'autophagie et l'entrée en phase sénescence. Les protéines p19<sup>ARF</sup> et p16<sup>INK4a</sup> sont encodés par le même locus INK4a/ARF (60) (61). Des études ont révélé que les niveaux d'expression de p16<sup>INK4a</sup>, et dans une moindre mesure p19<sup>ARF</sup>, sont progressivement augmentés au cours du vieillissement et des études d'association à l'échelle du génome ont lié le locus INK4a/ARF à un certain nombre de maladies associées au vieillissement chez l'homme (3). Dû à leur rôle essentiel dans l'induction de la sénescence, il est supposé que p53 et p16<sup>INK4a</sup> contribuent au vieillissement physiologique. Des études ont montré que ces deux protéines peuvent avoir une activité pro-vieillessement. En effet, les souris mutantes avec un vieillissement prématuré présentent des niveaux dramatiques de sénescence, et leurs phénotypes progéroïdes ont été améliorés par l'inactivation génétique de p16<sup>INK4a</sup> ou p53 (3) (62). Or, il existe un désaccord en ce qui concerne l'effet de p16<sup>INK4a</sup> et p19<sup>ARF</sup> sur la durée de vie. Certaines preuves ont montré que les souris présentant une augmentation légère et systémique des suppresseurs de tumeurs p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>ARF</sup> ou p53 présentent une longévité accrue, mais également une forte résistance au cancer et des niveaux réduits de dommages associés au vieillissement (3) (64). De plus, l'élimination de p53 aggrave les phénotypes de certaines souris mutantes progéroïdes (3). Ainsi, l'activation de p53 et du locus INK4a/ARF serait considérée comme une réponse compensatoire bénéfique afin d'endiguer la propagation de cellules endommagées et ses conséquences sur le vieillissement et le cancer. Or, ce point de contrôle cellulaire nécessite un système de remplacement cellulaire efficace qui implique l'élimination des cellules sénescences et la mobilisation des progéniteurs pour rétablir le nombre de cellules. Conscients du déclin des capacités de régénération tissulaire observé avec l'avancée en âge chez les mammifères, de multiples travaux ont montré que la sénescence cellulaire constitue un processus nuisible potentiellement tumorigénique et pouvant altérer l'homéostasie tissulaire, conduisant ainsi à l'émergence de pathologies chroniques et liées à l'âge (neurodégénératives, métaboliques ou inflammatoires) (Fig. 7A) (65). Lorsque les dommages sont généralisés, la capacité de régénération des tissus peut être épuisée ou saturée, et dans ces conditions extrêmes, les réactions des protéines p53 et p16<sup>INK4a</sup> peuvent devenir délétères et accélérer le vieillissement (3).

D'autres mécanismes basés sur les SMS peuvent également contribuer au dysfonctionnement des tissus (Fig. 7A et 8) (60). En effet, les cellules sénescences s'accumulent dans divers tissus et organes avec le vieillissement et ont été supposées perturber la structure et la fonction des tissus en raison des composants qu'elles sécrètent (60) (65). Bien que les cellules sénescences soient en arrêt de croissance cellulaire, elles restent toutefois métaboliquement très actives, ce qui leur permet d'exhiber un sécrétome particulier pouvant servir de messagers paracriniens et autocriniens (SMS) (60) (61) (65). Or, des preuves récentes ont démontré que ce sécrétome sénescence permettait à ces cellules d'influer leur microenvironnement et de propager les signaux de sénescence aux cellules environnantes, et ainsi contribuer au vieillissement et aux maladies associées (60) (61) (65). Plusieurs de ces facteurs pourraient avoir des effets délétères sur l'organisme en contribuant

aux dysfonctions tissulaires observées au cours du vieillissement, causées par la perte graduelle de la capacité de régénération de certains tissus (60) (65). Parmi les facteurs sécrétés par les cellules sénescents, on retrouve des chimioattractants, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (60) (61). Combinés ensemble, ces facteurs contribuent à l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire et au recrutement de cellules immunitaires dans les tissus en sénescence (60) (65). L'inflammation tissulaire chronique est d'ailleurs un trait commun aux organismes vieillissants et contribue grandement au développement de nombreuses maladies liées à l'âge. Il semble que les composants pro-inflammatoires de la SMS pourraient expliquer, au moins en partie, cette inflammation locale au sein des tissus et pourquoi les taux de cancer augmentent sensiblement au-delà de l'âge moyen (60) (65). Enfin, le SMS pourrait intensifier la détérioration des tissus liée à l'âge par la sénescence paracrine, un mécanisme récemment découvert par lequel les cellules sénescents propagent le phénotype de sénescence aux cellules saines voisines par la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  et de certains ligands de chimiokines (60) (65).

La sénescence pourrait être une stratégie visant à empêcher une cellule de proliférer jusqu'au stade de tumeur. Ce système anti-cancéreux requiert un système immunitaire efficace pour régénérer les tissus en phagocytant les cellules sénescents. Cependant, avec le vieillissement chronologique, les cellules sénescents s'accumulent en raison d'un ralentissement du renouvellement cellulaire (épuisement des cellules souches) et des mécanismes immunitaires endommagés qui éliminent les cellules sénescents. Or, une amélioration modérée des voies de suppression des tumeurs induisant la sénescence peut prolonger la longévité (64), et en même temps, l'élimination des cellules sénescents permettrait de retarder la survenue de pathologies liées à l'âge (62). Par conséquent, deux interventions conceptuellement opposées sont capables d'étendre la durée de vie.

### **1.2.8. L'épuisement des cellules souches.**

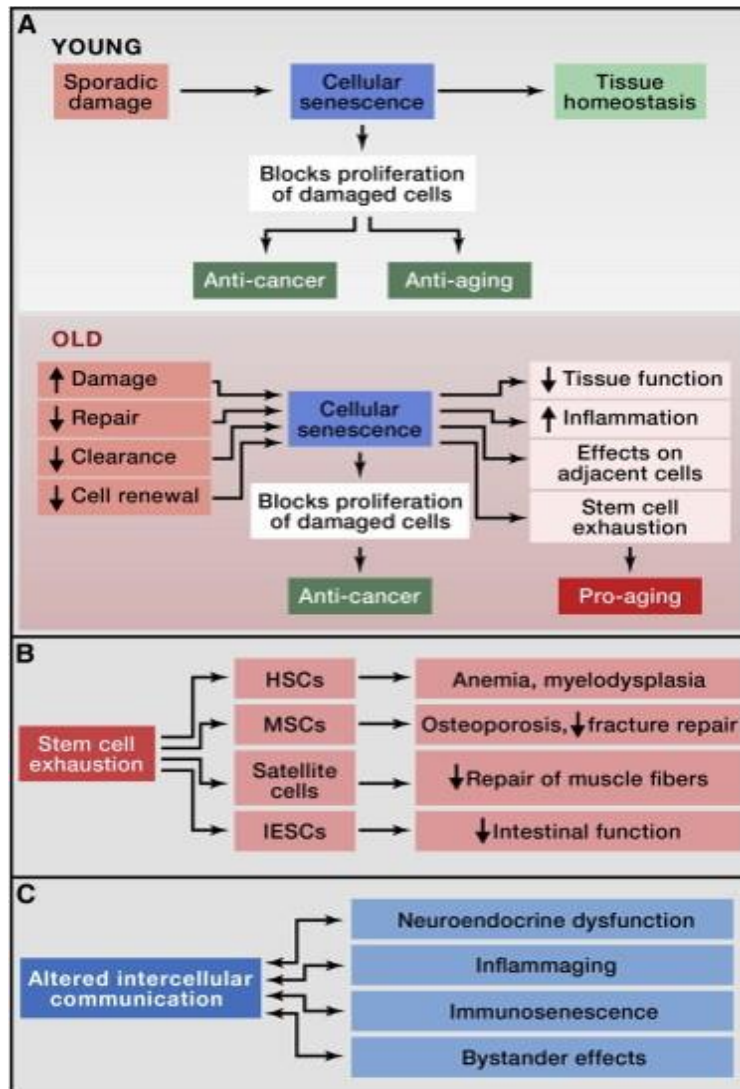
L'épuisement des cellules souches est suspecté de jouer un rôle décisif dans le vieillissement de l'organisme, car il freine le renouvellement cellulaire des tissus qui contiennent des cellules souches, un composant essentiel dans le processus de vieillissement. Il a été proposé que ces tissus vieillissants n'arrivent plus à se régénérer aussi facilement que les tissus plus jeunes en raison de la sénescence des progéniteurs. Par exemple, le vieillissement des cellules hématopoïétiques provoque une perte marquée d'efficacité du système immunitaire inné et/ou adaptatif, un phénomène appelé immunosénescence, ainsi qu'une augmentation de l'incidence de l'anémie et des malignités myéloïdes (Fig. 7B) (3). Des comportements similaires ont également été identifiés dans le cerveau, les os et les fibres musculaires (Fig. 7B) (3). L'accumulation de dommages à l'ADN et la surexpression des protéines qui inhibent le cycle cellulaire, telles que p16<sup>INK4a</sup>, pourraient expliquer ce comportement (66). Or, la répression de p16<sup>INK4a</sup> par diverses méthodes peut améliorer la fonction des cellules souches âgées et prévenir la sénescence cellulaire. Par exemple, la réduction au silence de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules satellites gériatriques rétablit leur quiescence et leur potentiel régénérateur (66). En effet, ce déclin

progressif de la fonction des cellules souches qui accompagne généralement le vieillissement peut résulter de plusieurs des caractéristiques du vieillissement mentionnées ci-dessus, seules ou en combinaison. Par exemple, le raccourcissement des télomères est une cause importante du déclin des cellules souches avec le vieillissement dans de nombreux tissus. Bien que les cellules souches adultes expriment la télomérase, elles ne sont pas pour autant immunisées contre l'attrition télomérique (66). L'accumulation de lésions et de mutations non télomériques à l'ADN, ainsi que les changements épigénétiques peuvent également influencer la fonctionnalité des cellules souches au fil du temps (66).

Bien qu'une prolifération déficiente des cellules souches et progénitrices soit évidemment préjudiciable au maintien à long terme de l'organisme, une prolifération excessive de cellules souches et progénitrices (hyperprolifération) peut également être délétère en accélérant l'épuisement des niches de cellules souches. L'importance de la quiescence des cellules souches pour la fonctionnalité à long terme des cellules souches a été démontrée dans le cas des cellules souches intestinales (CSI ou ISC en anglais) de drosophile, dans lesquelles une hyperprolifération entraîne leur épuisement et le vieillissement prématuré des mouches (67). Une situation similaire est rencontrée chez les souris p21 nulles, qui présentent un épuisement prématuré des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules souches neurales (3). À cet égard, l'induction du locus INK4a/ARF au cours du vieillissement et la diminution de la quantité d'IGF-I sérique peuvent toutes deux refléter une tentative de l'organisme de préserver la quiescence des cellules souches. En effet, il a été montré que les voies de signalisation sensibles aux nutriments, telles que la voie de l'insuline, de mTOR et de l'AMPK avec leurs transducteurs de signal en aval comme les facteurs de transcription PI3K, AKT et FOXO, modulent l'équilibre entre la quiescence et la prolifération des cellules souches au cours du vieillissement (5) (68). Par exemple, une signalisation excessive de mTOR provoque l'épuisement des cellules souches épidermiques et la perte de cheveux, une carence en FOXO freine la réponse au stress oxydatif et favorise l'épuisement des CSH, et des altérations dans la voie de signalisation de l'AMPK entraînent un épuisement des pools de CSH à long terme et une altération de l'hématopoïèse (68). De même, il a été signalé que la restriction calorique (RC) peut augmenter les fonctions intestinales et musculaires des cellules souches (68).

Des travaux récents ont rapporté que des expériences de transplantation hétérochronique (dans lesquelles les tissus d'une souris âgée sont transplantés dans une jeune souris ou vice versa) et des études de parabiose (dans lesquelles le système circulatoire d'une souris âgée est partagé avec une jeune souris) sont capables de limiter certaines des altérations métaboliques qui affectent le vieillissement des cellules souches (66). Par exemple, la transplantation de cellules souches d'origine musculaire de jeunes souris à des souris progéroides prolonge la durée de vie et améliore les changements dégénératifs de ces animaux (66) (69). En outre, les expériences de parabiose ont démontré que le déclin de la fonction des cellules souches neurales et musculaires chez les souris âgées peut être inversé par des facteurs systémiques provenant de jeunes souris (66). De même, l'inhibition du complexe mTORC1 par la rapamycine, qui peut retarder le vieillissement en améliorant la protéostasie, peut également améliorer la fonction des cellules souches dans l'épiderme, dans le système

hématopoïétique et dans l'intestin, notamment en stimulant l'autophagie (66) (68). De récentes études prometteuses suggèrent également que le rajeunissement des cellules souches pourrait inverser le phénotype du vieillissement au niveau de l'organisme (Fig. 8) (66). Par exemple, il est possible de rajeunir les cellules sénescents humaines par inhibition pharmacologique de CDC42, dont l'activité est accrue dans les CSH vieillissantes, accompagnée par un rétablissement de la fonction des CSH (66). Alors que nous avons constaté une diminution des SIRT-3 et SIRT-7 dans les CSH âgées, il a été rapporté que la surexpression de la sirtuine SIRT-3 ou SIRT-7 améliorerait la capacité régénératrice des CSH vieillissantes, ce qui suggère que les sirtuines sont aussi impliquées dans l'entretien de la fonction des cellules souches (66).



**Figure 7 – Sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et altération de la communication intercellulaire.**

(A) La sénescence est un état cellulaire caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, ainsi que par des modifications cellulaires et moléculaires particulières. Chez les organismes jeunes, par le biais des molécules pro-inflammatoires qu'elles sécrètent, les cellules sénescents recrutent les acteurs de l'immunité qui procèdent alors à leur élimination. En plus de ses fonctions dans le développement embryonnaire ou la réparation tissulaire, la sénescence cellulaire constitue une réelle barrière au développement tumoral. Cependant, si leur élimination n'a pas lieu, les cellules sénescents s'ac-

cumulent, favorisant le développement de cancers et la survenue de pathologies liées à l'âge. C'est le cas chez les organismes âgés, où les dommages généralisés et l'élimination déficiente des cellules sénescents entraînent leur accumulation, ce qui a un certain nombre d'effets délétères sur l'homéostasie tissulaire qui contribuent au vieillissement. **(B)** L'épuisement des cellules souches hématopoïétiques (HSC), des cellules souches mésenchymateuses (MSC), des cellules satellites et des cellules souches épithéliales intestinales (IESC) provoque, respectivement, l'anémie ou la myélodysplasie, l'ostéoporose, une diminution des mécanismes de réparation des fibres musculaires et une réduction de la fonction intestinale. **(C)** Des exemples d'altération de la communication intercellulaire associée au vieillissement sont illustrés ici avec notamment un dysfonctionnement neuroendocrinien ou encore une immunosénescence. Source : Prise de (3).

### **1.2.9. L'altération de la communication intercellulaire.**

La communication intercellulaire est un ensemble de mécanismes complexes, dont de nombreux vecteurs passent par une communication par le sang (hormones, molécules du système immunitaire...) (Fig. 8). Un des intérêts de communiquer entre cellules est par exemple de travailler ensemble en cas de présence de stimuli de nocivité ou de dommage cellulaire (inflammation, détection de toxiques...). Or avec l'âge, les cellules communiquent moins bien entre elles et ne réagissent plus efficacement en cas de besoin (3). En effet, les différents mécanismes de communication que les cellules utilisent sont perturbés à mesure que les cellules vieillissent, ce qui réduit leur capacité de transmettre l'information entre elles (3). Notamment, il a été montré que la signalisation neurohormonale tend à être dérégulée au cours du vieillissement, à mesure que les réactions inflammatoires augmentent, que l'immunosurveillance contre les agents pathogènes et les cellules pré-malignes diminue (Fig. 7C) (3).

Une altération importante de la communication intercellulaire associée au vieillissement est « l'inflammaging » (70). Ce terme fait référence à un phénotype pro-inflammatoire observé chez les mammifères vieillissants (70). Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle majeur dans la réaction inflammatoire, elles permettent la communication entre les cellules immunitaires et les cellules somatiques. Malheureusement, avec l'âge, cette communication peut se dérégler (70). Elle peut également être simplement plus fréquente, en réponse à l'augmentation des dommages du corps liés à l'âge (70). Ainsi, une fonction comme l'inflammation, qui était théoriquement bénéfique, peut devenir nocif avec le temps. De plus, des preuves expérimentales ont révélé que leur réponse chronique pourrait être partiellement responsable de la vulnérabilité, du développement des maladies qui contribuent et sont en corrélation avec le vieillissement de la population humaine (cancer, obésité, diabète de type II, athérosclérose...), et du déclin du vieil âge (70). « L'inflammaging » pourrait également fragiliser la fonction des cellules souches. De multiples causes peuvent être à l'origine de ce mécanisme singulier : l'accumulation de lésions dans les tissus pro-inflammatoires au fil du temps, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par des cellules sénescents (ex : IL-6 et TNF- $\alpha$ ), le système immunitaire défaillant qui ne parvient pas à éliminer les éléments pathogènes et les cellules-hôtes défaillantes, la mauvaise gestion de l'apoptose en raison du dysfonctionnement des mitochondries, une mauvaise réponse de l'autophagie et une accumulation de protéines endommagées qui entraîne une réaction inflammatoire, un changement des

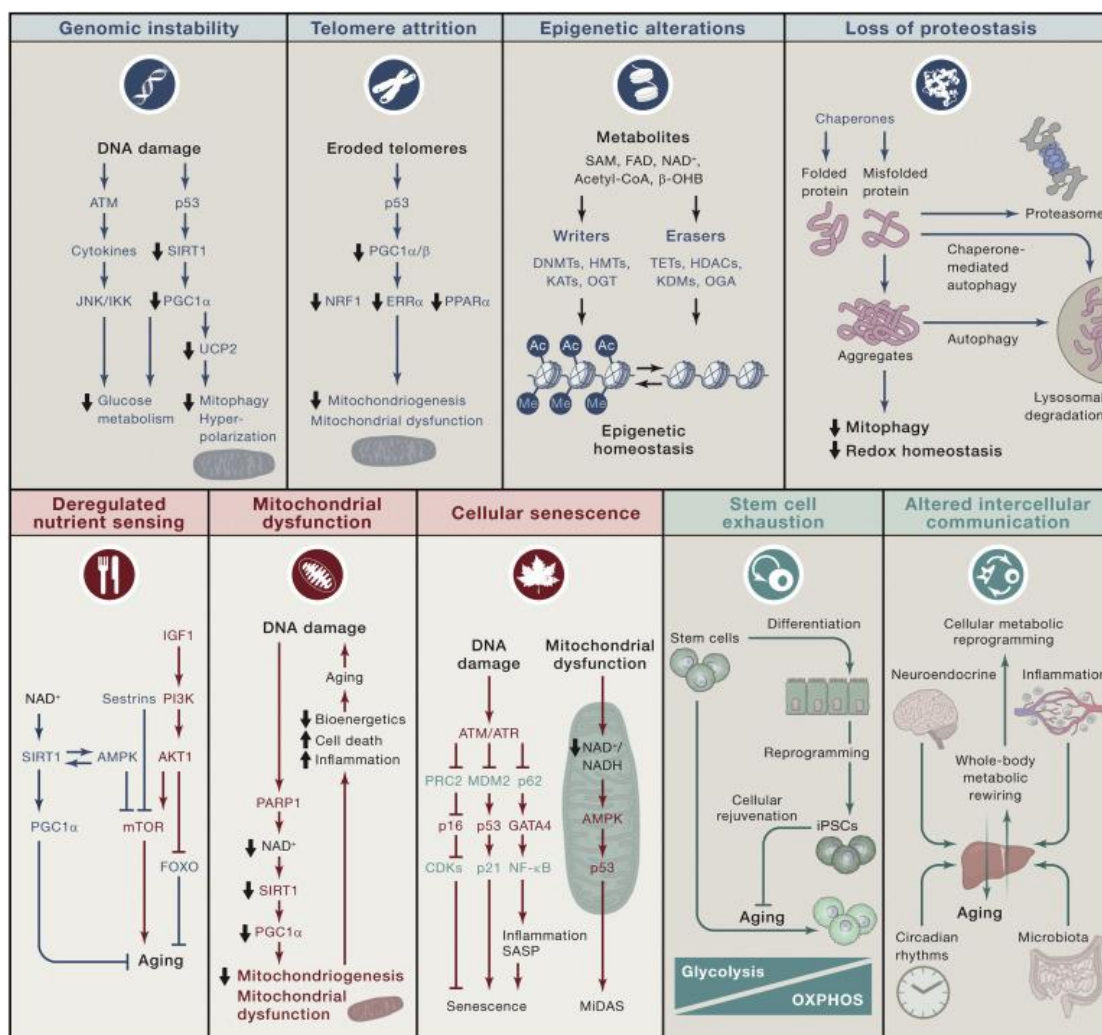
niveaux d'hormones qui régulent la production de cytokine (dont la testostérone) et l'activation accrue du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (70). Ces altérations donnent lieu à une activation accrue de l'inflammasome NLRP3, stimulant ainsi la sécrétion d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et -18 (IL-18), ainsi que d'autres voies pro-inflammatoires entraînant une libération du TNF- $\alpha$  et d'interférons (70).

Parallèlement à l'inflammation, la fonction du système immunitaire adaptatif se dégrade (3). Cela est dû à une involution chronique du thymus au cours du vieillissement, un organe qui soutient le développement et la différenciation des lymphocytes T (thymopoïèse) (71). Les lymphocytes T jouent un rôle décisif dans le système immunitaire adaptatif ; ils permettent au corps de répondre spécifiquement aux corps étrangers. Or, cette atrophie profonde liée à l'âge a pour conséquence une efficacité diminuée du développement des lymphocytes T et une émigration amoindrie des lymphocytes T naïfs vers la périphérie (71). Cette immunosénescence peut aggraver le phénotype de vieillissement au niveau systémique en raison de l'incapacité du système immunitaire à éliminer les agents infectieux, les cellules infectées et les cellules sur le point de subir une transformation maligne. De plus, l'une des fonctions du système immunitaire est de reconnaître et d'éliminer les cellules sénescentes qui s'accumulent dans les tissus vieillissants, ainsi que les lésions pré-malignes (3).

Le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B participe à la réponse immunitaire et à la réponse au stress. Il contrôle de nombreux gènes liés à l'inflammation et est considéré comme un responsable moléculaire de « l'inflammaging » (3). Or, l'inhibition génétique et pharmacologique de NF- $\kappa$ B permet de prévenir des caractéristiques du vieillissement avancé chez différents modèles de souris (72). De plus, l'inhibition de la protéine NF- $\kappa$ B entraîne un rajeunissement phénotypique des tissus (73). Il faut également noter que l'expression de la sirtuine SIRT-1 inhibe NF- $\kappa$ B (74). Les sirtuines pourraient alors avoir également une influence sur « l'inflammaging ». Des études ont révélé qu'en procédant à la désacétylation des histones et des composants des voies de signalisation, comme le NF- $\kappa$ B, la sirtuine SIRT-1 régule négativement les gènes associés à l'inflammation (74). La diminution des niveaux de la SIRT-1 est associée au développement et à la progression de nombreuses maladies inflammatoires, et l'activation pharmacologique de la SIRT-1 éviterait des réactions inflammatoires chez les souris (74). Quant aux sirtuines SIRT-2 et SIRT-6, elles réguleraient aussi négativement la réponse inflammatoire au moyen de la désacétylation des sous-unités du NF- $\kappa$ B et de la répression transcriptionnelle de leurs gènes cibles (75).

D'autres preuves *in vivo* liant l'inflammation et le vieillissement proviennent des travaux sur le facteur de déstabilisation des ARNm AUF1, qui est impliqué dans le processus de régulation de la réponse inflammatoire en médiant la dégradation de l'ARNm des cytokines (76). Les souris qui ont une carence en AUF1 présentent une sénescence cellulaire prononcée et un vieillissement prématuré des phénotypes, qui peuvent être sauvés par la ré-expression de ce facteur (76). L'AUF1 contribue également au maintien de la longueur des télomères en activant l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase TERT (76). En outre, de récentes études ont révélé que les réponses inflammatoires activent le NF- $\kappa$ B dans l'hypothalamus, déclenchant une voie de signalisation qui réduit la production de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

(GnRH), appelées aussi parfois gonadolibérine, par les neurones (77). Cette hormone peptidique est responsable de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et, à un degré moindre, de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) par l'antéhypophyse. La GnRH contrôle ainsi un processus complexe permettant le développement d'un follicule ovarien, l'ovulation, et le maintien du corps lutéal (corps jaune) dans le cycle menstruel chez la femme, mais contrôle aussi la spermatogénèse chez l'homme (77). Or, la dégradation de cette hormone pourrait accentuer de nombreux changements systémiques liés au vieillissement comme la fragilité osseuse, la faiblesse musculaire, l'atrophie de la peau, et la neurogénèse amoindrie (77). Cependant, le traitement à la GnRH prévient la neurogénèse altérée par le vieillissement et ralentit le développement du vieillissement chez les souris (77). De même, de nouvelles études ont démontré que la surexpression transgénique de la SIRT-1 spécifique au cerveau des souris est liée à un prolongement de la durée de vie (78). De plus, ces souris présentent des phénotypes cohérents avec un retard du vieillissement (78). Ces phénotypes révèlent une activité neuronale améliorée, notamment dans le noyau hypothalamique dorso-médian et latéral (78). Dans cette expérience, des informations complémentaires confirment le rôle de la SIRT-1 dans ces zones de l'hypothalamus quant au prolongement de l'espérance de vie (78). Ainsi, les résultats suggèrent que l'activité améliorée de la sirtuine SIRT-1 au sein du noyau hypothalamique latéral et dorso-médian joue un rôle essentiel dans la régulation de la longévité chez les mammifères.



### Figure 8 – Impact métabolique des caractéristiques du vieillissement.

Toutes les caractéristiques du vieillissement, telles que les caractéristiques primaires (**bleu**), les caractéristiques antagonistes (**rouge**) et les caractéristiques intégratives (**vert**) ont des répercussions importantes sur le métabolisme anabolique ou catabolique. Source : Prise de (5).

## 2. Les accélérateurs du vieillissement.

Les capacités fonctionnelles du système biologique de l'individu se développent au cours des premières années de vie, atteignent un pic au début de l'âge adulte et déclinent naturellement ensuite. Le rythme de ce déclin est déterminé, au moins en partie, par notre comportement et notre exposition aux risques tout au long de notre vie, qu'il s'agisse de notre alimentation, de l'exercice physique que nous pratiquons ou de notre exposition aux risques sanitaires que représentent le tabagisme, la consommation nocive d'alcool ou l'exposition à des substances toxiques (5). Ainsi, notre capacité à bien vieillir dépend de nombreux facteurs. Nous ne vieillissons pas forcément de manière uniforme. Le vieillissement, certes naturel et inévitable, est largement aggravé par notre mode de vie. Certains éléments environnementaux peuvent participer au processus de destruction et accélérer ainsi le vieillissement en augmentant le stress oxydant, l'inflammation et/ou la glycation (5).

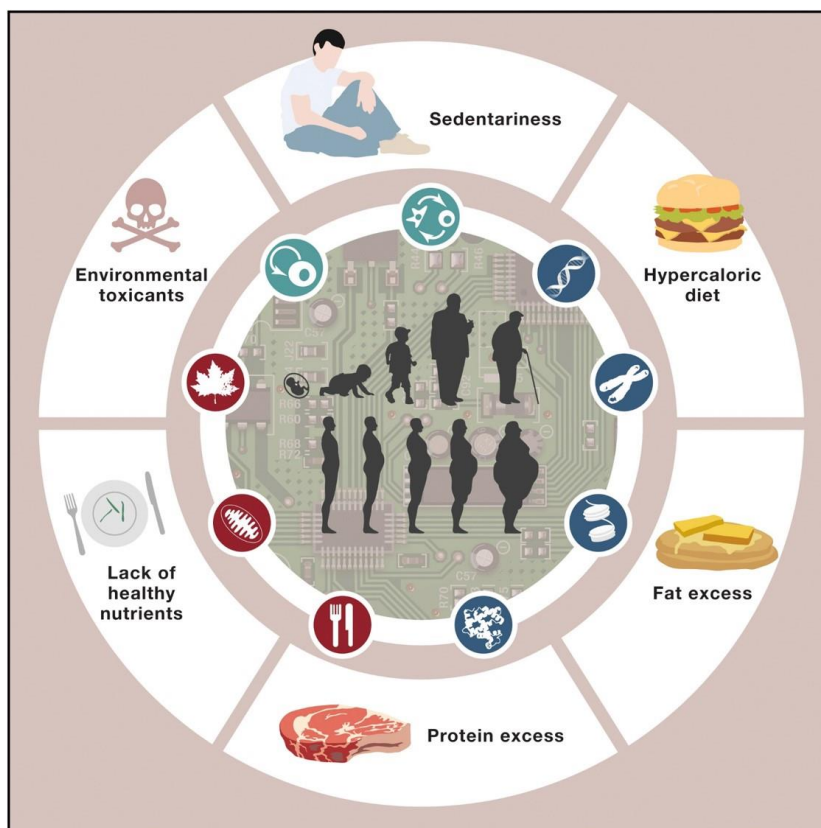
Au cours des deux dernières décennies, la qualité de vie globale et la longévité dans les pays occidentaux ont sans aucun doute été améliorées. L'espérance de vie humaine dans le monde a considérablement augmenté en moyenne d'environ 2,5 ans par décennie, attribuable aux changements environnementaux, notamment l'amélioration de la nourriture, de l'eau, de l'hygiène et des conditions de vie, la réduction de l'impact des maladies infectieuses grâce à la vaccination et aux antibiotiques, et l'amélioration des soins médicaux à tous les âges. Aujourd'hui, de nombreux humains vivent ainsi plus longtemps dans un environnement très différent et plus moderne avec à la fois une protection contre nombre de ses dangers, tels que les maladies infectieuses, et à l'abri de la nécessité de se nourrir intensivement pour éviter la famine. Cependant, ce nouveau mode de vie s'accompagne généralement par l'adoption d'un régime alimentaire riche en lipides saturés, en sucres ou en cholestérol couplé à l'absence d'aliments sains (ex : légumes, fruits, fibres, etc...) dans les habitudes alimentaires courantes, et à la sédentarité (Fig. 9) (5). Or, cette disponibilité immédiate d'aliments riches en calories, ainsi que le faible besoin d'exercice physique, entraînent un raz-de-marée de maladies métaboliques qui a un impact majeur à tous les âges. En effet, une consommation élevée en graisses alimentaires, en sucres, en protéines ou en cholestérol induit des conditions métaboliques menant à l'obésité, au diabète de type II et à l'hypercholestérolémie, pathologies chroniques connues pour leur impact sur les risques cardiovasculaires, mais décrites aussi comme capables d'exacerber le vieillissement cérébral (5). Ainsi, la longévité n'est pas une donnée fixe mais modulable en fonction des conditions environnementales.



Le choix de ce mode de vie peut provoquer le développement de plusieurs maladies : l'obésité, par exemple, est un facteur de risque pour la plupart des troubles du vieillissement. Ainsi, cette épidémie, en constante expansion, pourrait anéantir les bienfaits de cette civilisation moderne sur la santé. L'obésité, une maladie de l'adaptation aux récentes évolutions des modes de vie, résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. En effet, une mauvaise alimentation, caractérisée par un apport calorique élevé couplé à l'omission d'aliments sains dans les habitudes alimentaires, et à la sédentarité, demeure depuis plus de deux décennies le principal facteur de risque pour la santé. Ce déséquilibre aboutit à une accumulation des réserves stockées dans le tissu adipeux, entraînant elle-même de nombreuses complications. De nombreuses études ont montré que l'obésité accélérât le vieillissement. En effet, l'hypernutrition favorise l'inflammation systémique, l'insulino-résistance, la dysbiose et les altérations du système immunitaire (79). D'innombrables maladies chroniques associées au vieillissement sont causées ou accélérées par un régime alimentaire malsain, notamment l'athérosclérose, le cancer, le diabète de type II et les troubles neurodégénératives (79). Les patients obèses courent aussi plus de risques de souffrir de sarcopénie, une maladie associée au vieillissement qui entraîne une perte progressive de la masse musculaire (79). L'obésité accroît aussi le risque d'hypertension artérielle, d'athérosclérose notamment en raison d'une inflammation des artères, mais est aussi associée à de nombreux cancers. Parmi les complications, on compte également les maladies respiratoires (ex : syndrome d'apnée du sommeil, hypoventilation), ainsi que les troubles hormonaux (perturbation des cycles menstruels chez la femme) ou encore les maladies articulaires, telles que l'arthrose, en raison de la surcharge sur les os et articulations qui s'en trouvent fragilisés (79). L'obésité concerne aujourd'hui la quasi-totalité de la planète, dont de nombreux pays émergents. Selon l'OMS, 39% des adultes dans le monde sont en surpoids et 13% sont obèses en 2017. Le nombre de cas d'obésité a presque triplé depuis 1975. Les complications associées, en particulier le diabète de type II (44% des cas imputables au surpoids/obésité), les maladies cardiaques (23% des cas imputables) et les cancers (entre 7% et 41% des cas imputables au surpoids/obésité selon les localisations) entraînent le décès d'au moins 2,8 millions de personnes chaque année (selon l'OMS). Ainsi, le surpoids et l'obésité sont reconnus comme la cinquième cause de mortalité par l'OMS. En France, l'obésité concerne 17% des adultes et, chez les enfants, 16% des garçons et 18% des filles en 2017 : des chiffres à peu près stables depuis une dizaine d'années (selon l'OMS).

Comme mentionné plus haut, ce nouveau mode de vie est aussi associé à une surexposition à des substances toxiques spécifiques. Par exemple, la glycation (ou réaction de Maillard) est soupçonnée d'accélérer le vieillissement et de participer au développement de plusieurs maladies (l'athérosclérose, les maladies rénales et les diabètes de type I et II) (80). Il s'agit d'une réaction naturelle non-enzymatique qui consiste en la fixation des sucres sur les protéines, mais qui peuvent aussi provoquer l'oxydation des graisses, et, de ce fait, induit une modification de leurs propriétés biologiques. Ce phénomène se produit spontanément dans les organismes vivants et génère des produits terminaux de glycation (PTG) qui ne peuvent être détruites. Présents en quantité importante dans notre corps, les PTG ont été montré être hautement dangereux pour l'organisme et s'accumulent avec l'âge (80). Une partie d'entre eux se forme directement dans l'organisme notamment lorsque

le sucre sanguin est élevé, mais la majorité provient de notre alimentation. A l'inverse, une étude a démontré chez la souris qu'un régime restreint en PTG permet de prévenir les maladies vasculaires et rénales, les diabètes, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et d'augmenter l'espérance de vie dans les mêmes proportions que la RC (81). De même, les émulsifiants alimentaires et autres additifs, qui sont des composants omniprésents dans les aliments transformés, ont un impact négatif sur le microbiote intestinal, favorisant ainsi l'inflammation intestinale et le syndrome métabolique chez la souris (82).



**Figure 9 – Facteurs extrinsèques responsables du vieillissement.**

Le processus du vieillissement et les manifestations des pathologies associées à l'âge sont accélérés par divers aspects du mode de vie dit "occidental", notamment un régime hypercalorique associé à un apport excessif de graisses et de protéines avec une quantité limitée d'aliments sains (légumes, fruits, etc...), l'exposition à des substances toxiques environnementales (tabagisme, UV, alcool, etc...) et une sédentarité exagérée. Source : Prise de (5).

### 3. Des stratégies anti-vieillessement.

Le vieillissement, en tant que conséquence du temps qui passe, est un phénomène obligatoire et inéluctable. Outre la description des caractéristiques du processus de vieillissement, la conclusion la plus importante de la recherche sur le vieillissement est que ce dernier est désormais considéré comme un processus malléable (83). Plusieurs travaux de recherche ont montré qu'il était possible d'influencer le vieillissement ou la longévité par des facteurs expérimentaux, si bien que des stratégies capables de ralentir le vieillissement

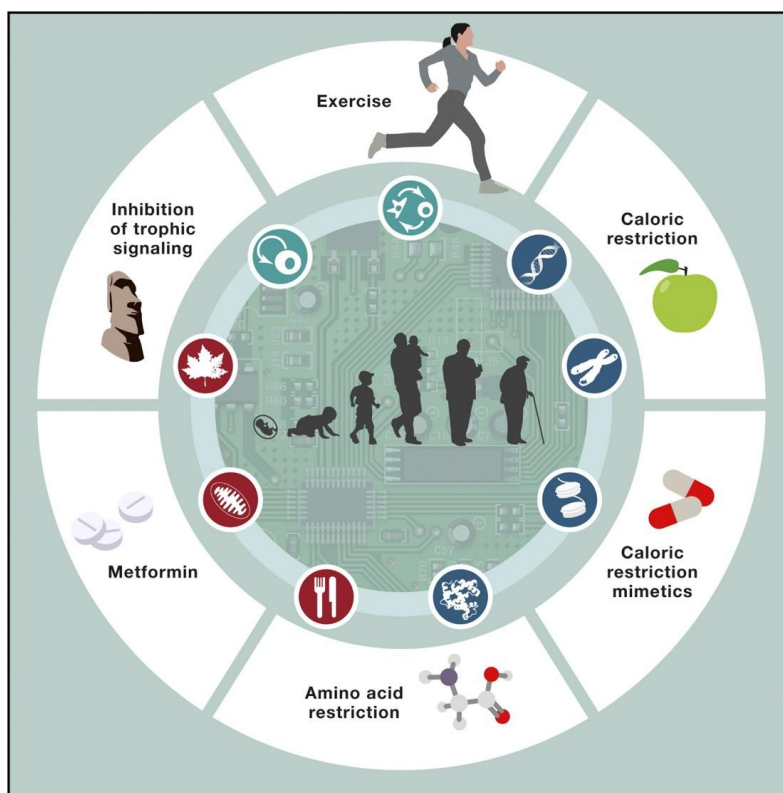
sont envisageables. En effet, la durée de vie des organismes peut être prolongée par des caractéristiques environnementales (83). Sur la base de ce cadre conceptuel, plusieurs questions se sont posées dans le domaine du vieillissement concernant les sources physiologiques des dommages provoquant le vieillissement, les réponses compensatoires qui tentent de rétablir l'homéostasie, l'interconnexion entre les différents types de dommages et les réponses compensatoires, et les possibilités d'intervenir de manière exogène pour retarder le vieillissement. Chaque caractéristique devrait idéalement remplir les critères suivants : elle devrait se manifester pendant le vieillissement normal, son aggravation expérimentale devrait accélérer le vieillissement, et son amélioration expérimentale devrait retarder le processus de vieillissement normal et donc augmenter la durée de vie. Par exemple, il est admis aujourd'hui que la RC constitue un des mécanismes les plus connus chez l'animal permettant de retarder le vieillissement, de prévenir les maladies chroniques et de favoriser la longévité. Il est commun à toutes les espèces, de la levure aux primates. Des études chez la souris ont montré qu'une RC de 30 à 50% permet un allongement de la durée de vie d'environ 30 à 60% (84). Cette diète calorique entraîne aussi un effet positif sur le vieillissement de plusieurs systèmes physiologiques : les animaux sont en effet protégés contre l'obésité, l'hypertension, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (84). Ce régime pourrait ainsi contrebalancer les effets de l'âge. Chez l'homme, il est certain que l'obésité et les régimes hypercaloriques ont des effets délétères prouvés à l'âge adulte et participent au vieillissement. Ils favorisent les maladies telles que le diabète, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires (79).

De plus, de nouvelles expérimentations ont démontré que des facteurs génétiques sont également impliqués dans la régulation de la durée de vie de l'organisme. La souche mutante *daf-2* du *C. elegans* a été la première mutation simple-gène menant à une durée de vie prolongée. Cette découverte représente le premier lien mécanistique entre la détection des éléments nutritifs et la longévité. Il s'est avéré que la protéine codée par le gène *daf-2* est le seul récepteur du ver apparenté aux récepteurs d'insuline des mammifères (38). Le rôle central et évolutif de cette voie de signalisation dans la longévité a été fermement établi dans les années suivantes. De nouveaux membres de la voie ont également été identifiés chez le *C. elegans* et d'autres organismes de laboratoire. Chez la drosophile, il a été montré qu'une combinaison hétéroallélique d'allèles des gènes du récepteur de l'insuline résulte en une extension de 85% de la durée de vie maximale (85), alors que la mutation nulle du gène *chico* codant pour la protéine substrat unique du récepteur de l'insuline chez la drosophile permet de prolonger de 48% la durée de vie moyenne des mouches homozygotes et de 36% des mouches hétérozygotes (86). Les souris mutantes pour les membres de cette voie ont également une longue vie (87) (88), et que les variantes génétiques naturelles des composants de la voie se sont avérées associées à la longévité chez l'homme (89) (90). Surtout, ces interventions qui prolongent la durée de vie peuvent également réduire la morbidité et améliorer la santé pendant le vieillissement. En plus de la voie IIS, diverses études ont montré que plusieurs voies de signalisation ont des rôles bien établis dans la modulation du processus de vieillissement. Effectivement, un certain nombre de ces mécanismes, qui montrent une forte conservation évolutive, peuvent réguler la durée de vie chez la levure, les invertébrés multicellulaires, les souris et éventuellement les humains, avec notamment les facteurs de choc thermique (HSF), les protéines kinases activées par

l'AMP (AMPK), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), les sirtuines et la cible de la rapamycine (mTOR) (83). L'activité mitochondriale ou encore le maintien de l'autophagie peuvent également favoriser le vieillissement (31) (67) (83).

### 3.1. Ces facteurs environnementaux qui régulent le vieillissement.

A ce jour, il existe une multitude d'approches expérimentales qui offre un moyen d'améliorer la santé et d'augmenter la longévité des organismes, telles qu'une réduction modérée de l'apport calorique (ou restriction calorique), l'apport limité d'AA, la pratique d'une activité physique, ou encore l'administration de composé qui miment les effets métaboliques, hormonaux et physiologiques de la RC sans être associée à une perte de poids importante (par exemple la resvératrol, la spermidine) (Fig. 10) (5). Les médicaments ciblant les réseaux de détection des nutriments, comme la rapamycine et la metformine, peuvent également participer à ce procédé (Fig. 10) (5).



**Figure 10 – Les stratégies pour ralentir le vieillissement.**

Le vieillissement et les manifestations des troubles associés à l'âge peuvent être retardés par la pratique d'une activité physique régulière, la restriction calorique, l'ingestion de petites molécules qui imitent les effets du jeûne mais ne sont pas associées à une perte de poids importante répertoriées sous le terme de « mimétiques de la restriction calorique », l'apport contrôlé en acides aminés, l'inhibition pharmacologique des cascades de transduction des signaux trophiques (par exemple avec la rapamycine et la metformine, un médicament antidiabétique aux effets métaboliques pléiotropiques). Il est possible que ces interventions prolongent également la durée de vie. Source : Prise de (5).

### 3.1.1. Les vertus de la restriction calorique pour prolonger la durée de vie.

L'une des découvertes les plus importantes dans le domaine de la recherche sur le vieillissement est l'effet d'une RC, sans malnutrition, sur la longévité. Le premier cas signalé est généralement attribué à C.M. McCAY et ses collaborateurs (1989) pour son travail sur les rats (91). Cet auteur a rapporté que des rats soumis à un régime hypocalorique voient leur espérance de vie augmenter jusqu'à 45% par rapport aux rats nourris à volonté (*ad libitum*) (91). Ces travaux démontraient pour la première fois que la longévité d'un individu ne dépendait pas uniquement de son patrimoine génétique, mais qu'elle pouvait aussi être sensiblement accrue par une modification de son environnement. Depuis lors, de nombreuses recherches ont été menées sur la RC. En effet, des travaux ultérieurs menés chez diverses espèces, de la levure aux primates, ont montré le caractère quasi universel des effets bénéfiques d'une RC sans dénutrition sur la santé (84). La RC est une réduction modérée de l'apport calorique assurant néanmoins des apports qualitatifs suffisants pour n'induire ni carence, ni malnutrition. Cela consiste généralement à restreindre l'apport alimentaire de 30 à 50% par rapport à la ration ingérée spontanément et doit être débutée tôt dans la vie, juste après la maturation sexuelle. Elle est la seule intervention non génétique connue capable d'augmenter la longévité chez plusieurs espèces d'animaux. De l'organisme unicellulaire aux mammifères, de nombreux taxons sont utilisés comme supports aux études de la RC. Les données actuelles invitent à émettre l'hypothèse que des espèces différentes répondent de manière similaire à une diminution plus ou moins importante des disponibilités alimentaires en allongeant leur durée de vie. Cela suggère que les réponses de l'organisme lors d'une RC dépendent de mécanismes, conservés au cours de l'évolution, également impliqués dans la lutte contre le vieillissement (92) (93) (94).

Indépendamment des effets sur la longévité, il a été suggéré que la restriction du régime calorique offre un large éventail de bienfaits sur la santé des organismes. Certaines maladies, comme les cancers, l'atrophie cérébrale, le diabète, les maladies cardiovasculaires ou les infections, sont moins fréquentes chez les animaux soumis à une restriction diététique, et certain(e)s organes ou fonctions semblent avoir un vieillissement ralenti (84). Les rongeurs et les primates sont les deux espèces les plus souvent étudiées dans les essais sur les animaux pour la RC. Par exemple, une étude sur des souris a révélé que la RC réduit la prolifération des lymphocytes T, diminue le poids corporel et améliore la fonction immunitaire, en plus d'allonger la durée de vie (95). Une autre étude a rapporté que des souris transgéniques au vieillissement accéléré (progénoïdes) soumises à une RC de 30% voyaient leur durée de vie médiane triplée, ainsi que de nombreux aspects du vieillissement accéléré fortement retardés. Les souris ont conservé 50% de neurones en plus et une fonction motrice complète bien au-delà des souris nourries normalement (96). Ces avantages sur la santé observés chez les rongeurs s'étendent aux primates : les singes rhésus soumis à une RC modérée (~30%) sur du long terme présentent une réduction de la sarcopénie, de l'incidence au diabète, au cancer, aux maladies cardiovasculaires et à l'atrophie cérébrale (94) (97). Tous ces changements ont été associés à une augmentation de la durée de vie des animaux (94). Alors que la probabilité de découvrir si la RC prolonge ou non la vie humaine est plutôt

faible en raison des limites éthiques et logistiques de la conception de la recherche, de nombreuses études sur la RC humaine ont noté des changements favorables dans les biomarqueurs corrélés à la longévité, en particulier ceux liés à la fonction cardiovasculaire et glucorégulatrice. En effet, les humains qui suivent une RC pendant une période limitée montrent une diminution des facteurs de risque associés aux maladies coronariennes, une amélioration de la fonction glucocorticoïde et une sensibilité accrue à l'insuline (98). Il a également été démontré que la RC atténue le stress oxydatif (98). Cependant, la RC ne protège pas contre toutes les pathologies liées à l'âge : bien qu'elle augmente la durée de vie, elle n'améliore pas les fonctions musculaires et osseuses chez l'homme (98). Ceci indique que sa pratique dans un environnement réel peut présenter des inconvénients.

Une explication proposée pour les effets bénéfiques d'un régime hypocalorique sur la longévité est une augmentation de la biogenèse mitochondriale et/ou de l'activité respiratoire chez les différents organismes modèles (99) (100). Cette caractéristique exige l'activation directe de certains facteurs de longévité comme les sirtuines. Celles-ci forment une classe d'enzymes, des déacétylases, qui ralentissent le vieillissement en agissant sur de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la réparation de l'ADN, la résistance au stress oxydatif ou la mort cellulaire. D'une manière plus générale, l'activation des sirtuines augmente la sensibilité à l'insuline, la lipolyse, diminue l'inflammation et jouerait un rôle préventif dans les maladies neurodégénératives et la carcinogenèse (101). En fait, la RC est responsable de l'augmentation significative de l'activité de l'enzyme SIRT-1 (99) (100). En effet, de nombreuses études ont démontré le lien entre l'activation de la SIRT-1 et les effets anti-vieillessement de la RC (99) (100). Ainsi, la SIRT-1 serait responsable de la désacétylation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$ , qui augmente à son tour la biogenèse et l'activité des mitochondries (99). La RC entraîne aussi une perte de poids corporel, ce qui confère des avantages fonctionnels en atténuant les complications physiques de l'obésité, notamment l'excès de tissu adipeux intramusculaire et la surcharge articulaire. Au-delà de ces aspects mécaniques, la RC élimine le tissu adipeux blanc, en particulier la graisse viscérale, qui est particulièrement nocive pour un vieillissement sain en raison de son activité pro-inflammatoire et diabéto-gène (102). En effet, la RC induit une diminution de l'adipogenèse et stimule la mobilisation des AG libres au niveau des adipocytes via la SIRT-1 (103). Par ailleurs, de nombreuses études soutiennent un rôle des voies de signalisation sensibles aux nutriments dans la RC. En particulier, il a été montré que la RC diminue la sécrétion d'insuline et réduit également le taux d'IGF-I circulant, qui joue un rôle clé dans la protection contre le cancer et le ralentissement du vieillissement (95) (102). En outre, la RC constitue un inducteur efficace de l'autophagie dans les tissus, ce qui a de multiples effets anti-vieillessement car elle favorise un contrôle de qualité efficace des organites, soutient une activité optimale des cellules souches, améliore les fonctions immunologiques et inhibe la transformation maligne (5). Des réponses autophagiques efficaces améliorent également plusieurs aspects des maladies associées au vieillissement, notamment l'athérosclérose, la neurodégénérescence, la stéatose hépatique et le diabète de type II (104). Effectivement, la RC déclenche des réponses autophagiques bénéfiques par le biais de capteurs de nutriments comme la SIRT-1, l'AMPK et la mTORC1 (105).

Même si la RC présente des effets bénéfiques, elle peut également altérer certaines fonctions physiologiques essentielles pour l'organisme dans certaines conditions, telles que la réponse immunitaire, les capacités de mémorisation, les capacités de reproduction ou les mécanismes de cicatrisation et de réparation de lésions, probablement en raison d'une diminution des ressources énergétiques. Par exemple, la cicatrisation de plaies cutanées est réduite chez des rats placés en RC de 40%, cicatrisation qui peut être considérablement améliorée si les rats sont nourris *ad libitum* sur une courte période avant que la plaie ne soit infligée aux animaux (84). D'autres travaux ont également rapporté des effets négatifs de la RC chez les rongeurs sur la résistance au stress ou aux infections provoquées par des bactéries, des virus ou des vers, même s'il a été démontré que la RC permet de ralentir le déclin lié à l'âge de certaines fonctions immunitaires (84). Chez les macaques, une RC modérée à long terme (~30%) provoque des effets négatifs sur l'axe neuroendocrinien de la reproduction (106). Chez l'Homme aussi des effets délétères de la RC ont été rapportés, comme par exemple, une diminution de la densité osseuse (84). Finalement, malgré tous les avantages que peut apporter le fait de diminuer notre prise alimentaire, nous n'avons pas encore toutes les connaissances nécessaires pour développer et appliquer des protocoles de RC adaptés au long terme chez l'Homme et être sûr de l'innocuité d'un tel régime sur l'organisme.

### **3.1.2. Les mimétiques de la restriction calorique.**

Même s'il s'avère que la RC augmente l'espérance de vie et la durée de vie maximale, il est difficile d'imaginer des humains se soumettant toute leur vie à un régime hypocalorique draconien afin d'augmenter leur espérance de vie. Par conséquent, il y a eu un intérêt accru pour le développement d'agents pharmacologiques qui agissent comme des « mimétiques de la RC ». De tels agents pourraient fournir les effets métaboliques, hormonaux et physiologiques bénéfiques de la RC, activer des voies d'actions similaires, améliorer la résistance au stress oxydant, augmenter la longévité, retarder l'apparition des pathologies liées à l'âge et maintenir les fonctions de l'organisme dans un état jeune, sans avoir à modifier l'apport alimentaire ou à subir les conséquences négatives potentielles d'une restriction excessive. Aujourd'hui, plusieurs composés naturels ou synthétiques ont été isolés et proposés comme mimétiques potentiels de la RC, tels que des molécules polyphénoliques d'origine végétale (ex : resvératrol, quercétine, butéine, picéatannol), des inhibiteurs glycolytiques (ex : 2-désoxyglucose) ou certains composés régulant l'expression génique (ex : metformine, rapamycine) (5).

#### **a. Le resvératrol, composé phénolique le plus prometteur.**

Au cours des quinze dernières années, l'intérêt pour les bienfaits des composés polyphénoliques a beaucoup augmenté depuis que certaines études ont suggéré qu'il existait une relation entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et la prévention à certaines maladies, telles que les cancers, les maladies

cardiovasculaires ou certaines maladies neurodégénératives (107) (108). Le resvératrol, un composé phénolique naturel trouvé notamment dans la peau du raisin, est un des candidats le plus prometteur quant à sa capacité à mimer les effets bénéfiques de la RC. Cette molécule de la famille des stilbènes présente plusieurs propriétés bénéfiques, telles qu'une action anti-inflammatoire, antioxydante et anti-cancérigène. Administré à des levures, il stimule la SIRT-1 et augmente leur longévité de 70%, imitant ainsi les effets d'une RC (109). Les effets bénéfiques de cette molécule sont aussi observés même en cas de suralimentation (110). En effet, l'apport de resvératrol chez des rats obèses a augmenté leur taux de survie de près de 20% par rapport à des souris obèses sans régime particulier (110). Elle procure également de nombreux effets bénéfiques qui contrecarrent les effets néfastes d'un régime enrichi en lipide en diminuant la masse corporelle, la pression artérielle et les pathologies cardiovasculaires, et en augmentant la sensibilité à l'insuline (110). De même, une autre étude a montré que les souris, soumises à une alimentation riche en lipides, qui ne recevaient pas de resvératrol sont vite devenues obèses. En revanche, leurs congénères qui recevaient un supplément de resvératrol ont pris 40% de poids en moins, alors même qu'elles mangeaient le même menu et la même quantité de nourriture (111). En analysant les tissus musculaires des souris, ils ont également remarqué qu'ils contenaient davantage de mitochondries et que leur activité était plus importante, entraînant ainsi une augmentation de la dépense énergétique et une diminution de la prise de poids (111). Pour vérifier que leur capacité oxydative était accrue, un test d'endurance a été réalisé sur les deux groupes de souris. En comparaison avec des souris de poids normal mais non supplémentées en resvératrol, elles courent deux fois plus longtemps (111). De plus leur sensibilité à l'insuline s'est avérée meilleure que celle des souris de l'autre groupe, ce qui diminue le risque de diabète de type II (111). En outre, une autre étude a montré que le resvératrol permet d'augmenter significativement la durée de vie de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'espérance de vie passe de dix mois à quatorze mois avec la supplémentation en resvératrol (112). Il a aussi permis de réduire certains symptômes de la maladie d'Alzheimer, tels que des dépôts d'amyloïdes et l'hypophosphorylation de la protéine Tau (112). Chez les souris supplémentées, l'analyse des cerveaux a révélé des niveaux plus élevés de la SIRT-1 et d'AMPK (112). Ces résultats prometteurs semblent plus attrayants que la perspective d'une longue vie de privations. Si le resvératrol reste le plus prometteur, d'autres polyphénols pourrait bien eux aussi prétendre au titre de mimétique de la RC. C'est notamment le cas de la butéine (un flavonoïde extrait de l'arbre à laque), du picéatannol (un produit de dégradation du resvératrol), la fisétine (un polyphénol des fraises) et de la quercétine (un composant actif de nombreuses plantes médicinales).

## **b. La metformine, du diabète à la longévité.**

La metformine, molécule extraite de la plante *Galega officinalis* communément appelée lilas, a été initialement utilisée dans le traitement des troubles du métabolisme glycémique, particulièrement l'hyperglycémie et le diabète de type II. Elle améliore la sensibilité à l'insuline, induit la glycolyse et supprime la gluconéogenèse dans le foie (113). En plus de son utilisation chez les personnes diabétiques, la metformine est



également employée comme agent anti-viral et anti-cancéreux (114). Il est maintenant considéré comme un potentiel traitement anti-vieillesse après que des scientifiques se soient aperçus après avoir examiné les dossiers médicaux des patients traités que ces personnes avaient non seulement beaucoup moins de chances de mourir que les autres diabétiques mais que leur taux de mortalité était inférieur de 15% par rapports aux autres patients (115). Plusieurs rapports suggèrent alors que toutes ces actions de la metformine ressemblent dans une certaine mesure aux effets de la RC. Ainsi, des études ont évalué les effets de la metformine sur la longévité. Des travaux ont révélé que des rongeurs qui ont reçu ce traitement ont vu leur longévité augmentée de 8% en moyenne (116). Par ailleurs, ils ont constaté que ce traitement diminuait significativement le risque de tumeurs mammaires (116). En outre, une autre étude a rendu compte d'une espérance de vie augmentée de près de 14% chez les animaux qui avaient reçu de la metformine à condition d'avoir été démarrée suffisamment tôt, à l'âge de trois mois (46). Cependant, démarrer la prise de metformine plus tard dans la vie des souris à l'âge de neuf mois n'augmente l'espérance de vie que de 6% et aucun effet bénéfique si l'administration de la metformine ne démarre qu'à l'âge de quinze mois (46). Ainsi, la metformine, à l'image de la RC, a été signalée prolonger la durée de vie lorsque celle-ci a débuté tôt dans la vie de l'animal. Or, l'efficacité de la metformine dépend également de la dose. Si elle est trop élevée, non seulement elle n'est pas efficace sur la longévité mais elle devient même toxique (117). Au niveau cellulaire, cette molécule anti-diabétique active la protéine AMPK, connue pour être un élément majeur dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire, ce qui conduit à une diminution de la synthèse d'ATP au niveau des mitochondries et à une augmentation de l'AMP cellulaire. Ces deux actions conduisent à la stimulation des processus cataboliques de l'ATP, tels que la glycolyse, l'oxydation des AG, la stimulation de la captation du glucose par le muscle, l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique et de la lipogenèse (118). En résumé la metformine mime certains des avantages de la RC en régulant le métabolisme énergétique cellulaire et en améliorant la sensibilité à l'insuline (117).

### **c. La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR.**

La rapamycine, molécule produite par la bactérie *Streptomyces hygroscopus*, a été initialement purifiée comme un agent anti-fongique (43). Par la suite, des études ont démontré qu'elle agissait comme un immunosuppresseur utilisé notamment dans les traitements post-opératoires lors de greffes d'organes pour éviter les rejets (43). La rapamycine est connue pour diminuer l'activité d'une serine/thréonine kinase, mTOR, impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la survie cellulaire (43). Un grand nombre d'études ont montré qu'une perturbation dans la voie de signalisation de mTOR induit des pathologies ainsi que des cancers (43). Par ailleurs, l'inhibition de TOR par la rapamycine empêche dans certains cas la prolifération des cellules tumorales (43). De même, cette molécule est également efficace dans l'allongement de la durée de vie. Effectivement, l'inhibition de TOR avait déjà permis d'augmenter la longévité de la levure, du ver nématode ou de la mouche à fruits, mais des études récentes montrent que c'est aussi le cas chez les mammifères. Une étude a montré que la rapamycine permet d'augmenter l'espérance de vie des souris quand elle est

administrée dès l'âge de neuf mois (119), et également chez des souris âgées de vingt mois (44). Ils ont constaté que la durée de vie moyenne des mâles avait augmenté de 10 et 9% et celle des femelles de 18 et 14% par rapport aux souris non traitées, respectivement (44). Cependant, une autre étude sur des souris a montré que la rapamycine prolonge effectivement la longévité, mais pouvait aussi profondément altérer l'homéostasie du glucose (120). Or, il semblerait que l'administration de la rapamycine de manière intermittente permette de diminuer ces effets secondaires. En effet, une dose de rapamycine administrée à vie de manière intermittente (trois fois par semaine pendant deux semaines, suivie d'une pause de deux semaines) à partir de l'âge de deux mois a permis d'augmenter la durée de vie en évitant les effets négatifs de la rapamycine sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (121).

### **3.1.3. Les effets bénéfiques d'une restriction des protéines.**

Certaines études ont montré qu'une modification de l'équilibre des composants alimentaires sans réduction des apports globaux peut aussi augmenter la durée de vie d'insectes et de rongeurs. Ceci suggère que certains nutriments puissent impacter la longévité selon les quantités apportées, notamment en modifiant le ratio de protéines sans diminuer la quantité totale d'aliments ingérés. De plus, des travaux récents sur des organismes modèles ont révélé qu'un apport réduit de nutriments spécifiques, plutôt que de calories globales, est à l'origine des bienfaits de la RC sur la santé, et où les protéines alimentaires jouent un rôle clé. Ni la restriction glucidique ni la restriction lipidique ne semblent être des alternatives efficaces à la RC. Des recherches ont démontré que la restriction lipidique n'avait aucun effet sur la longévité, même constatation pour une restriction glucidique (122) (123). De plus, les deux formes de restriction ne parviennent pas à modifier le taux de production d'ERO ou les dommages oxydatifs de l'ADN. En revanche, la restriction protéique semble être un bon candidat. Effectivement, plusieurs études ont montré que la restriction protéique permet d'augmenter la durée de vie maximale des rongeurs d'environ 20%, mais aussi de diminuer la production d'ERO et les dommages oxydatifs de l'ADNmt (124). Parmi les trois éléments nutritifs majeurs (protéines, glucides, lipides), les protéines sont en position unique pour réguler la durée de vie et mimer les effets bénéfiques de la RC sur le vieillissement.

Par la suite, plusieurs études ont manipulé les AA individuels dans l'alimentation et ont montré que des dilutions d'un seul AA essentiel peuvent prolonger la durée de vie. Alors que quelques études ont montré qu'une restriction du tryptophane augmente la durée de vie (125), l'effet de loin le plus cohérent est la réduction de l'AA essentiel de la méthionine. Comme pour la restriction du tryptophane, un régime pauvre en méthionine prolonge la durée de vie des souris (124). Par ailleurs, il a été rapporté qu'une restriction de 40% de méthionine diminue à la fois la production d'ERO mitochondriales, ainsi que les dommages oxydatifs dans l'ADNmt, aux protéines et aux lipides (124). D'autres études ont fourni des preuves supplémentaires sur les effets d'une restriction à la méthionine sur la santé. Par exemple, une réduction significative du développement

du cancer de la prostate chez les souris transgéniques a été observée à la suite d'une alimentation à 0,12% de méthionine par rapport aux souris nourries avec des aliments contenant 0,86% de méthionine (126). De plus, des souris ob/ob déficientes en leptine âgées de dix semaines élevées avec un régime à 0,12% de méthionine ont été sauvées d'une stéatose sévère et ont présenté des taux de triglycérides (TG), d'insuline plasmatique, et des réponses inflammatoires liées à l'obésité considérablement réduits (127). Afin de démêler les effets respectifs de la restriction méthionine et de la restriction protéique, des chercheurs ont examiné l'impact d'une restriction de 40% de tous les AA alimentaires à l'exception de la méthionine sur les biomarqueurs du vieillissement chez des rats (128). Ils ont découvert que cette restriction n'a pas réussi à réduire la production d'ERO mitochondriales et les dommages oxydatifs dans l'ADNmt (128). Ainsi, les résultats suggèrent fortement que la méthionine est le seul AA qui peut affecter la production d'ERO mitochondriales et le stress oxydatif en manipulant son apport (128).

En résumé, ces études ont révélé qu'environ la moitié de l'effet de la RC sur la longévité semble être attribuable à une diminution de l'apport en protéines. En effet, ni la restriction glucidique ni la restriction lipidique n'ont eu un effet sur la durée de vie des rongeurs. En outre, de nombreux changements physiologiques chez les souris soumises à un régime pauvre en protéines imitent les effets de la RC. Cependant, de nombreuses preuves indiquent que la restriction à la méthionine pourrait expliquer la plupart ou la totalité des avantages de la restriction protéique dans la prolongation de la durée de vie. De plus, plusieurs rapports ont suggéré que l'extension de la durée de vie par la restriction protéique (ou à la méthionine) est due à l'inhibition de la voie de signalisation mTOR (129). Une baisse des taux d'IGF-I, de glucose sérique et d'insuline était également observées chez les souris, suggérant la possible implication de la voie de signalisation de l'insuline/IGF dans le contrôle de la longévité (129). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et appliquer ces principes à l'alimentation humaine afin d'obtenir des effets bénéfiques potentiels en ce qui concerne le processus de vieillissement et/ou les maladies chroniques liées à l'âge. En effet, un régime restreint en méthionine est à la fois faisable et tolérable, ce qui suggère qu'il pourrait être une alternative intéressante à la RC pour ceux qui recherchent les propriétés améliorant la santé.

### **3.2. Ces facteurs génétiques qui influencent le vieillissement.**

Le contrôle génétique de la longévité a été révélé par les travaux pionniers de Thomas JOHNSON et Cynthia KENYON au début des années 1990. Ces auteurs ont en effet montré pour la première fois que la mutation d'un seul gène, *age-1* ou *daf-2*, était suffisante pour doubler la durée de vie du nématode. De plus, le vaste ensemble de recherches montrant que l'alimentation modifie la durée de vie conduisent inévitable-

ment à la conclusion que les capteurs de nutriments et leurs voies de signalisation en aval servent de médiateurs à ces réponses. Nous présentons ici les connaissances sur les principales découvertes en matière de voies de signalisation des nutriments dont il a été démontré qu'elles prolongent la durée de vie des organismes.

### **3.2.1. Les voies de signalisation impliquées dans le processus de vieillissement.**

Bien que de nombreux facteurs environnementaux contribuent aux processus de vieillissement chez les individus, le vieillissement présente également une forte composante génétique (38). Avec le développement de nouvelles techniques de laboratoire en génétique, plusieurs études ont démontré que l'inactivation d'un gène pouvait, à elle seule, moduler positivement ou négativement le vieillissement et la longévité d'un organisme (36). Beaucoup de ces gènes ont ensuite été reliés à des voies de signalisation plus importantes, ayant elles-mêmes un impact majeur sur le vieillissement. Ainsi, il a été proposé que ces profils d'expression génétiques qui modulent la sénescence et le vieillissement puissent être le résultat d'effets secondaires de mécanismes qui sont importants pendant la croissance cellulaire et le développement de l'organisme (60). Un très grand nombre d'études sur les facteurs génétiques, biologiques et environnementaux ont d'abord été mises en lumière chez l'organisme modèle, le *C. elegans*. En effet, le premier gène capable de moduler la longévité a été découvert chez le nématode *C. elegans* à la fin des années 1980 (37). Cette découverte a engendré un intérêt grandissant pour les études sur la génétique du vieillissement chez l'humain par le biais d'organismes modèles. Depuis la fin des années 1980, quelques centaines de gènes modulant le vieillissement chez le *C. elegans* ont été découverts (130). L'analyse de ces différents gènes a permis d'identifier plusieurs voies de signalisation impliquées à la fois dans le processus biologique du vieillissement, ainsi que dans la modulation de la longévité. Parmi les voies cellulaires qui régulent le vieillissement, il a été possible d'identifier celles de l'insuline/IGF (IIS), du récepteur de la rapamycine (mTOR) et des protéines kinases activées par l'AMP (AMPK), pour n'en nommer que quelques-unes des plus importantes (83). Les gènes importants faisant partie de ces voies de signalisation ont été démontrés pour moduler le vieillissement chez d'autres modèles d'études (levure, drosophile et souris). Ces voies de longévité conservées à travers l'évolution feront l'objet de la présente section.

#### **a. La voie de signalisation à l'insuline/IGF (IIS).**

L'axe de signalisation à l'insuline/IGF est probablement la voie la plus étudiée dans le contexte de longévité. En effet, le lien entre le vieillissement et la voie de signalisation de l'insuline/IGF (IIS) a attiré une attention considérable sur la base de plusieurs éléments de preuve montrant que la perturbation de la cascade de signalisation IIS peut prolonger considérablement la durée de vie de diverses espèces. Cette voie est connue

pour réguler la longévité chez le nématode, la drosophile, les souris et certains indices laissent croire qu'elle modulerait aussi celle de l'humain. Effectivement, l'implication de la voie IIS dans le processus de longévité a d'abord été démontrée dans l'organisme modèle *C. elegans* (37) (38). Ce schéma d'action a par la suite été confirmé dans d'autres modèles, dont la drosophile et la souris (36) (131). On sait que la mutation des gènes qui partagent des similitudes avec ceux des humains impliqués dans la voie de réponse du signal insuline/IGF peut prolonger considérablement la durée de vie, mais peut également ralentir le vieillissement et augmenter la résistance au stress. On peut citer comme exemples les mutants *daf-2*, *age-1* et *daf-16* du nématode *C. elegans*, les mouches femelles mutantes homozygotes *InR* et *chico*, et les souris mutantes *Prop1* et *Pit1* à longue durée de vie (37) (38) (86) (87) (88) (132) (133).

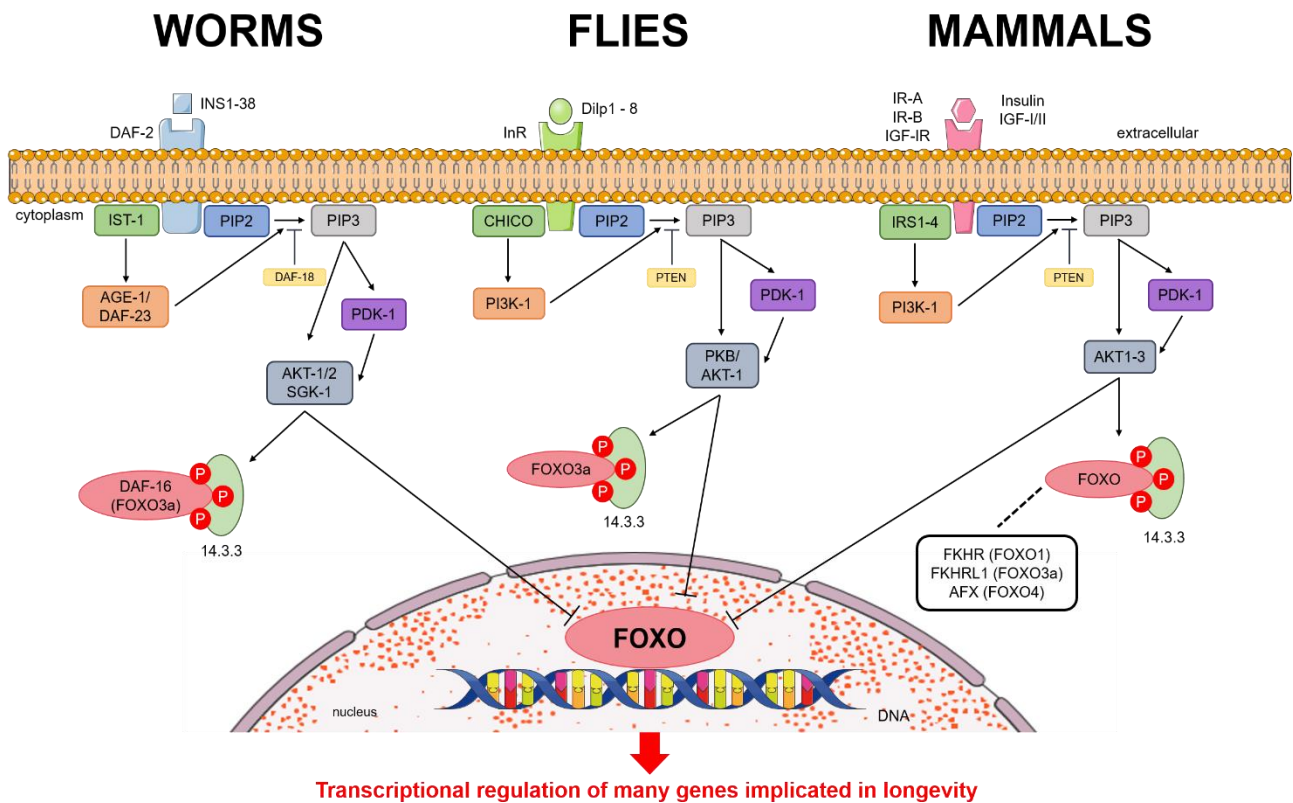
### **i. Définition.**

La voie de signalisation à l'insuline/IGF (IIS) est omniprésente dans tous les organismes multicellulaires. Des études génétiques récentes chez la drosophile et le *C. elegans* montrent que cette voie est largement conservée chez les métazoaires (36) (131). L'insuline est généralement associée au maintien de l'homéostasie du glucose, mais elle a également d'autres fonctions. Les mutations qui altèrent la voie IIS peuvent avoir des effets pléiotropiques sur la croissance, le développement, le contrôle de l'apoptose, l'homéostasie métabolique (glucidique, lipidique et protéique), la fécondité et le vieillissement (131). Bien que les altérations dans la voie de réponse à l'insuline puissent avoir des effets très néfastes, dont un évident est le diabète de type II chez les mammifères, la réduction de la voie IIS est apparue comme un moyen important, conservée au cours de l'évolution, de prolonger la durée de vie du ver nématode *C. elegans*, de la mouche à fruits *D. melanogaster* et de la souris *M. musculus* (36) (131).

La voie intracellulaire, telle qu'elle a été identifiée jusqu'à présent, est considérablement plus complexe chez les mammifères que chez le ver et la mouche. Chez les deux invertébrés, elle est constituée d'un récepteur unique de type insuline (DAF-2 chez le nématode ; InR chez la drosophile), de plusieurs ligands peptidiques de type insuline (INS1-38 chez le nématode ; Dilp1-8 chez la drosophile) et des autres composants intracellulaires de la branche canonique PI3K (Fig. 11). En revanche, les mammifères possèdent une insuline et deux facteurs de croissance (IGF-I/II), qui régulent respectivement l'activité des récepteurs de l'insuline (IR-A/B) et de des IGF structurellement très proches du récepteur de l'insuline (IGF-IR) (Fig. 11) (36).

L'ensemble de ces effets résultent de la liaison des ligands avec une haute affinité à un récepteur membranaire spécifique présent à la surface de toutes les cellules de l'organisme (Fig. 11). Ce récepteur possède une activité tyrosine-kinase dans leur domaine intracellulaire qui permet une autophosphorylation du récepteur puis la phosphorylation sur des résidus tyrosine des protéines substrats, comme IST-1 chez le nématode, CHICO chez la drosophile ou encore IRS1-4 chez les mammifères, ainsi que la création de complexes macromoléculaires d'activation à proximité du récepteur (Fig. 11) (36). Après liaison du ligand à son récepteur

cellulaire, il se produit une cascade de transduction du signal intracellulaire activant tour à tour la PI3K-1 (phosphoinositide-3 kinase de type 1), ainsi que d'autres protéines kinases activées en cascade : la PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1), puis l'AKT-1/2 (RAC-alpha/beta serine-threonine-protein kinase) ou PKB (protéine kinase B) ou la SGK (serum and glucocorticoid-induced protein kinase) (Fig. 11) (36). Brièvement, la protéine substrat va interagir avec le domaine tyrosine-kinase du récepteur de l'insuline, ce qui va induire la phosphorylation des résidus tyrosines spécifiques sur les protéines substrats (36). Les protéines substrats ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par la PI3K-1 (Fig. 11). Elle va ensuite phosphoryler les PIP2 membranaires (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate), créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires (Fig. 11) (36). En effet, la PIP3 ainsi activée permet le recrutement d'autres protéines kinases, telles que la PKB/AKT ou la SGK et la PDK-1, dont l'activation permet une cascade d'activation/phosphorylation de protéines intracellulaires impliquées dans l'effet métabolique de l'insuline (Fig. 11) (36). Un élément majeur pour la transmission du signal insulinique dans le noyau de la cellule est la protéine FOXO (Forkhead box, sub-group O), qui appartient à la famille des facteurs de transcription *Forkhead box (FOX)*, caractérisés par la présence d'un domaine conservé particulier de liaison à l'ADN de type *Forkhead (FKH)*. Chez les mammifères et chez l'Homme, la sous-famille FOX « O » compte quatre membres : FOXO1a ou FKHR (Forkhead homolog in rhabdomyosarcoma), FOXO3a ou FKHL1, FOXO4 ou AFX et FOXO6. La protéine kinase activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler les facteurs de transcription FOXO sur trois résidus très conservés (Thr24, Ser256 et Ser319 pour FKHR/FOXO1 ; Thr32, Ser253 et Ser315 pour FKHL1/FOXO3a ; Thr28, Ser193 et Ser258 pour AFX/FOXO4), depuis le ver jusqu'à l'Homme (Fig. 11) (134). La phosphorylation de FOXO se traduit par la séquestration de ces facteurs dans le cytoplasme via l'interaction avec la protéine chaperonne 14.3.3 (Fig. 11) (134). De cette manière, la voie à l'insuline inhibe l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription FOXO, ce qui les empêche d'agir et d'activer au niveau nucléaire des groupes spécifiques de gènes cibles. À l'inverse, en l'absence de ligand, l'AKT est inactive et les FOXO ne sont plus phosphorylés et se trouvent ainsi transportés dans le noyau où ils agissent comme activateurs de la transcription, déclenchant ainsi une multitude de réponses cellulaires (Fig. 11) (134). Ces facteurs de transcriptions jouent des rôles importants dans la régulation de l'expression des gènes. Les FOXO contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire à la fois en phase G1 et en phase G2 (134). Ces facteurs de transcription permettent également la réparation des dommages de l'ADN ainsi que la détoxification cellulaire des ERO produites par le stress oxydatif, ce qui a pour résultat d'accroître la durée de vie (135) (136). Enfin, dans certaines cellules, les FOXO peuvent déclencher la mort cellulaire par apoptose. Il existe également un autre mécanisme majeur impliqué dans la régulation négative du signal insulinique via la déphosphorylation de la PIP3 en une forme inactive par l'enzyme PTEN (phosphatase and TENSin homolog). Son action reverse le signal de la PI3K (Fig. 11) (36).



**Figure 11 – Cascade d’activation de la voie de signalisation à l’insuline/IGF, conservée au cours de l’évolution.**

Cette cascade d’activation contrôle le cycle de phosphorylation/déphosphorylation du facteur de transcription DAF-16/FOXO. Lorsque le peptide ligand analogue à l’insuline se lie à son récepteur, la voie est alors activée et s’en suit une cascade de phosphorylation successive venant phosphoryler DAF-16/FOXO. Le signal est transduit, soit directement à partir du récepteur, soit indirectement via le ligand du récepteur de l’insuline vers la PI3K/AGE-1. La PI3K/AGE-1 convertit la PIP2 en PIP3, le second messager, et cette activité est antagonisée par la PTEN/DAF-18. Des niveaux élevés de la PIP3 entraînent l’activation de la protéine kinase (AKT/PKB/SGK) et de la PDK, et la PDK phosphoryle ensuite la protéine kinase (AKT/PKB/SGK), l’activant ainsi complètement. La protéine kinase activée (AKT/PKB/SGK) phosphoryle le facteur de transcription DAF-16/FOXO. La phosphorylation inactive DAF-16/FOXO et le séquestre dans le cytoplasme. Quand la voie est inactive, lorsqu’il n’y a pas de transduction du signal, DAF-16/FOXO n’est pas phosphorylé par la protéine kinase (AKT/PKB/SGK) et peut alors être transloqué dans le noyau où la protéine peut agir comme facteur de transcription sur l’ADN et activé la transcription de différents gènes impliqués dans le vieillissement. L’encadré indique les noms spécifiques des trois facteurs de transcription impliqués dans la voie intracellulaire à l’insuline chez les mammifères, alors que les vers et les mouches n’en contiennent qu’un seul. **AGE-1** : AGEing alteration-1 ; **AKT-1/2** : RAC-alpha/beta serine-threonine-protein kinase 1/2 ; **DAF-2/16/18/23** : abnormal Dauer Formation-2/16/18 ; **Dilp1-8** : *Drosophila* insulin-like peptides 1-8 ; **FKHR** : Forkhead in Rhabdomyosarcoma ; **FKHL1** : FKHR-like 1 ; **FOXO** : Forkhead box, sub-group O ; **IGF-I(R)** : Insulin-like Growth Factor-1 (Receptor) ; **InR** : Insulin-like receptor ; **IR-A/B** : Insulin receptor A/B ; **IRS1-4** : Insulin Receptor Substrates ; **IST-1** : Insulin receptor Substrate homolog ; **P** : Résidu phosphorylé ; **PDK-1** : 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 ; **PI3K** : Phosphatidyl-inositol 3’-Kinase ; **PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; **PIP3** : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ; **PKB** : Protéine Kinase B ; **PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog ; **SGK** : Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase. Source : Adaptée de (36) (137).

## ii. Une fonction conservée de la signalisation de l'insuline/IGF dans la longévité des organismes.

La première voie de longévité qui a été découverte est celle de l'insuline/IGF. Cette voie est conservée au cours de l'évolution : des mutations dans de nombreux gènes de la voie de signalisation de l'insuline/IGF (*InR*, *PI3K*, *FOXO*, etc...) prolongent la durée de vie de divers organismes allant du nématode aux mammifères ; et plusieurs d'entre eux ont été liées à la longévité humaine. Ces découvertes sont issues de la recherche génétique fondamentale sur le petit ver *C. elegans*, dont les premiers mutants à longue durée de vie ont été isolés (38) (37).

### Le nématode *Caenorhabditis elegans*.

L'implication de la voie de signalisation à l'insuline/IGF dans les mécanismes évolutivement conservés qui contrôlent le vieillissement et la durée de vie a été suggérée pour la première fois par les résultats obtenus chez les invertébrés. Les premières études faites chez le nématode sur la longévité ont montré l'implication de la protéine AGE-1 (ou DAF-23) dans le processus. Cette protéine est l'orthologue de la PI3K des mammifères. La perte de fonction d'*age-1* chez le ver mène à une augmentation de la longévité allant jusqu'à 65% de la durée de vie moyenne des animaux (37). Quelques années plus tard, l'équipe de Cynthia KENYON a démontré que la perte de fonction du gène *daf-2* procure les mêmes effets sur la longévité que l'inhibition d'*age-1* (38). Le gène *daf-2* code une protéine semblable au récepteur de l'insuline/IGF et pourrait être l'ancêtre commun du récepteur de l'insuline et celui de l'IGF-I (IGF-IR) humain. Les vers *C. elegans* ayant une mutation dans le gène *daf-2* pouvaient vivre deux fois plus longtemps que des vers de type sauvage (38). Non seulement ces vers mutants pour le récepteur de l'insuline vivent plus longtemps que les vers non mutés, mais ils vieillissent moins vite (38). Ces découvertes ont été importantes car elles montrent que non seulement la mutation d'un seul gène peut conduire à un allongement de la longévité, mais également du rôle de la voie IIS comme régulateur central du vieillissement. En outre, il a été démontré que les effets de la perte de fonction de ces deux protéines sur la longévité est dépendante de l'activité d'un troisième gène, un facteur de transcription de la famille *FOXO*, *daf-16*, dont les homologues vertébrés sont *AFX*, *FKHR* et *FKHRL1* (138). En effet, des mutations dans le gène *daf-16* suppriment le phénotype de *daf-2* et d'*age-1*, suggérant alors que ce facteur de transcription clé est négativement régulé par la voie IIS (138). Cependant, les nématodes chez lesquels une mutation du récepteur de l'insuline a induit l'activation de *daf-16/FOXO3a* ont une durée de vie trois fois supérieure aux nématodes témoins. La capacité de *daf-16/FOXO3a* d'accroître la longévité chez le *C. elegans* semble être liée à l'induction, par ce facteur de transcription, de gènes de résistance au stress oxydatif (139). Ainsi, l'activation éventuelle du facteur de transcription *daf-16/FOXO* indique que la voie de signalisation semblable au récepteur de l'insuline/IGF régule le vieillissement en modulant l'expression de groupes de gènes spécifiques.



Chez le ver, *age-1* et *daf-2* sont également impliqués dans le contrôle de l'entrée des vers dans un stade larvaire intermédiaire appelé « dauer », un stade de développement alternatif permettant aux vers de résister à différents stress (surpopulation, manque de nourriture, etc...) accompagné d'un arrêt de croissance (140). Sous cette forme, les vers peuvent survivre pendant plusieurs mois dans des conditions non-favorables à leur croissance. Leur métabolisme est ralenti et leur résistance aux stress est augmentée. Cependant lorsque les conditions s'améliorent, la croissance est stimulée par l'activation de la voie IIS (140). Cette dernière agit ainsi comme senseur de stress, induisant l'entrée, mais aussi la sortie du stade « dauer » pour revenir dans une courbe de développement normal. D'ailleurs, il a été montré que le gène *daf-2* agit au cours du développement pour contrôler la décision de l'animal d'entrer dans un état de diapause (« dauer ») dans les environnements surpeuplés et à ressources limitées. Plus tard, il est montré que le gène *daf-2* fonctionne exclusivement à l'âge adulte pour réguler la durée de vie (141). Ainsi, il agirait deux fois : une fois pour affecter l'entrée au stade larvaire « dauer », qui ne peut avoir lieu que pendant le développement, et une autre fois plus tard à l'âge adulte, pour affecter le vieillissement. De plus, des études ont montré que des mutations fortes dans le récepteur *daf-2* déclencheraient un arrêt du développement larvaire au stade « dauer », alors que des mutations faibles qui permettaient la croissance jusqu'à l'âge adulte permettraient un doublement de la durée de vie moyenne et les animaux vieilliraient plus lentement (141).

L'homologie structurelle et fonctionnelle de DAF-2 avec le récepteur d'insuline de mammifère suggère que des composants de la voie de signalisation de l'insuline pourraient agir dans le contrôle du métabolisme et de la diapause chez le *C. elegans*. En effet, il a été démontré qu'une diminution de la signalisation de *daf-2* induisait d'importants changements métaboliques et développementaux (140). En particulier, les mutations nulles de *daf-2* ou d'*age-1* provoquent l'arrêt au stade larvaire « dauer » (140). Ces larves sont petites, leurs organes ont moins de cellules, ont ralenti leurs taux métaboliques, stockent de grandes quantités de graisse et vivent plus longtemps que les adultes reproducteurs (140). En outre, les vers présentant une mutation dans la voie IIS présentent aussi une résistance accrue au stress oxydatif : les mutants *daf-2* expriment des niveaux élevés d'enzymes anti-oxydantes, telles que la catalase et la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD), et la mutation *age-1* empêche partiellement la diminution associée à l'âge de la catalase chez les vers adultes (139). Ces mutants sont aussi grandement résistants à l'hypoxie, à l'empoisonnement aux métaux lourds et à la contamination par des bactéries pathogènes.

### **La mouche *Drosophila melanogaster*.**

L'effet d'une mutation du récepteur de l'insuline sur le prolongement de la durée de vie ne se limite pas au ver *C. elegans*. Des études récentes ont démontré une augmentation significative de la longévité des mouches *D. melanogaster* qui présentent des mutations dans la voie IIS. La perturbation du récepteur de type insulinaire (dInR) ou la perte de la protéine substrat du récepteur de l'insuline (CHICO) entraîne une prolongation de la durée de vie adulte (85) (86). En effet, une étude a rapporté que des déficiences dans le récepteur

de l'insuline chez la mouche (*dInR*), homologue aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF-I chez les mammifères ainsi qu'à DAF-2 chez le *C. elegans*, prolongent également de manière significative la durée de vie des adultes (85). En outre, il a été démontré que les femelles ayant des combinaisons d'allèles de la mutation du gène *dInR* sont petites en raison du faible nombre de cellules, stériles et vivent 85% plus longtemps que les témoins de type sauvage (85). Les mouches mutantes à longue durée de vie partagent certaines caractéristiques importantes avec les adultes de type sauvage qui sont en diapause reproductive, notamment une augmentation des TG et du niveau de SOD et une chute de la synthèse d'hormone juvénile dans le cerveau, une neurohormone qui influence la reproduction chez les insectes et présente une certaine homologie fonctionnelle avec les hormones thyroïdiennes des vertébrées (85).

La durée de vie des mouches femelles est également prolongée suite à la mutation de l'homologue du substrat du récepteur d'insuline, *chico* (86). A cet égard, une étude a signalé que les mouches mutantes femelles homozygotes *chico1/chico1* sont viables, de taille réduite et leur durée de vie est allongée de 48% (86). Les mâles homozygotes ont une durée de vie courte, tandis que les mouches hétérozygotes pour les deux sexes de taille normale ont une longévité accrue ( $\leq 36\%$  chez les femelles et 13% chez les mâles) (86). En effet, les mutants homozygotes pour le gène *chico* ont des niveaux de SOD accrus et une fécondité fortement réduite (86). De plus, des expériences impliquant un sauvetage génétique des effets de *chico* sur la croissance somatique chez les mouches transgéniques et des croisements avec des mouches hétérozygotes pour une mutation dominante provoquant la stérilité des femelles ont fourni la preuve que ni le phénotype nain ni l'infertilité ne sont nécessaires pour augmenter la longévité des mouches mutantes *chico* (86).

De même, des altérations dans l'expression d'un sous-ensemble de ligands (*Dilp*) responsable de la signalisation de l'insuline chez les mouches entraînent une modulation de l'IIS et de profondes conséquences sur la longévité et le métabolisme (142) (143). Effectivement, une étude a démontré que l'ablation des cellules neurosécrétrices (IPC), le site de production des *Dilp*2, 3 et 5, engendre une augmentation de 10,5% de la durée de vie des mâles, de 18,5% chez les femelles vierges et 33,5% chez les femelles accouplées (142). Ces cellules sont considérées comme les homologues des cellules  $\beta$  du pancréas des mammifères. Les *Dilp* sont des protéines conservées au cours de l'évolution qui sont impliqués comme chez les mammifères dans la régulation de la croissance et l'homéostasie des glucides et présentent divers schémas d'expression spatio-temporelle, ce qui indique qu'ils ont des rôles fonctionnellement distincts (144). Cette prolongation de la durée de vie s'est produite malgré un doublement des niveaux de glucose à jeun dans l'hémolymphe des adultes, similaire à celle observée chez les mammifères diabétiques (142). En outre, les mouches ablationnées présentent une résistance accrue au stress oxydatif et à la famine (142). Elles ont également un stockage relativement accru de lipides et d'hydrates de carbone, une diminution de la fécondité et une tolérance moindre à la chaleur et au froid (142). Cependant, une autre étude a rapporté qu'une surexpression du *Dilp6* dans le corps gras adulte prolonge aussi la durée de vie des mouches femelles, conférée par une surexpression spécifique du niveau de *dFOXO* (143). Contrairement à ces résultats, l'inhibition du *Dilp6* dans le corps gras adulte bloque les effets positifs observés sur la longévité (143). De plus dans ces conditions expérimentales, l'expression du *Dilp6* dans le corps gras est

associée à une réduction significative des niveaux en ARNm du *Dilp2* et *Dilp5* dans le cerveau et du peptide Dilp2 circulant. Il a été établi que ce contrôle du niveau de Dilp6 par dFOXO dans le corps gras peut aussi augmenter le stockage de glucides et de lipides, réduire la fécondité et améliorer la résistance au stress oxydatif (143).

Chez le ver et la mouche, l'expression de *FOXO* suffit dans certaines circonstances à prolonger la durée de vie de ces organismes, ce qui définit *FOXO* comme « un gène de longévité » (145) (146). Les fonctions de FOXO dans la longévité et dans la résistance à divers stress sont conservées au cours de l'évolution puisque l'activation de *dFOXO* accroît aussi la durée de vie de la drosophile comme le montrent deux études récentes (145) (146). L'expression induite de *dFOXO* dans le corps gras dès le début de l'âge adulte a augmenté la durée de vie de 20 à 50%, réduit la fécondité d'environ 50 % et a augmenté la résistance au paraquat (générateur de radicaux libres) des mouches femelles (145). En revanche, aucun effet sur la durée de vie n'a été observé chez les mouches mâles (145). Cette fois-ci, une autre étude a montré que l'induction intestinale d'un deuxième membre de la famille FOX, *dFKH*, l'homologue de *FOXA* des mammifères (*pha-4* chez le nématode *C. elegans*), est suffisante pour prolonger la durée de vie des mouches (146). Chez la drosophile, *dFKH* joue notamment un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, alors que chez les mammifères, les FOXA régulent le métabolisme du glucose dans le foie, le pancréas et le tissu adipeux (146). En outre, le knock-out (KO) spécifique de *FOXA2* dans le foie entraîne un phénotype de vieillissement prématuré et une augmentation de l'activité de la voie mTOR chez la souris, connue pour aussi être un régulateur central de la longévité chez les eucaryotes (146). Dans cette étude, il a été montré que *dFKH* interagit avec *dAKT* et est phosphorylé par celle-ci, ce qui le place comme un régulateur transcriptionnel central (146). Parallèlement, les intestins surexprimant *dFKH* présentent une amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale chez les mouches âgées, sans que la prolifération des CSI ne soit modifiée (146). Des études ont montré que le vieillissement entraîne également une diminution du stockage des lipides intestinaux, probablement due à une diminution globale de la capacité d'absorption, ce qui entraîne une réduction des réserves métaboliques du corps entier (147). Or, la surexpression directe de *dFKH* dans l'intestin permet d'induire l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport transmembranaire de nutriments dans les entérocytes (EC), telles que CTR1B, ZIP1, CG1208, MDR50 et PMP70 (146). Ces données démontrent que *dFKH* contribue ainsi à une amélioration de l'absorption des nutriments et à une résistance accrue à la famine qui a tendance à diminuer avec l'âge (146). Enfin, il est montré qu'une régulation à la hausse de trois orthologues des transporteurs de nutriments (ZIP1, CG1208 et PMP70) est aussi observée dans l'intestin grêle de souris KO pour *IRS1*, ce qui suggère une conservation évolutive de ce mécanisme (146). Ainsi, ces études sur les facteurs de transcription de la famille FOX ont révélé que la voie IIS peut fonctionner de manière non-autonome dans la cellule pour réguler le processus de vieillissement et la longévité des mouches adultes.

## La souris *Mus musculus*.

L'implication de la voie IIS dans la longévité a aussi été confirmée dans certains modèles de souris, notamment les souris naines *Snell (Pit1<sup>dw</sup>)* et *Âmes (Prop1<sup>df</sup>)*, les souris *FIRKO* et les souris *IGF-IR<sup>+/-</sup>* (87) (88) (133). Les deux premiers modèles sont mutés respectivement dans le gène *Pit-1 (pituitary specific transcription factor 1)* et dans le gène homéotique *prophet of Pit-1 (Prop-1)*. La mutation dans le gène *Prop-1* empêche la formation de l'hypophyse antérieure, alors que celle du gène *Pit-1* empêche la différenciation des cellules de l'hypophyse responsables de la sécrétion de certains peptides (133). En effet, ces derniers sont des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle du développement adénohypophysaire (133). Les souris *Snell (Pit1<sup>dw</sup>)* et *Âmes (Prop1<sup>df</sup>)* présentent toutes deux une longévité exceptionnelle, sans fragilité et sans maladies liées à l'âge, par rapport à leurs témoins de type sauvage, avec une augmentation de 50% chez les mâles et 64% chez les femelles (133). Cependant, les deux modèles de souris mutantes homozygotes ont de faibles taux d'hormone de croissance (GH), de thyroïdostimuline (TSH), de prolactine (PRL), ainsi que d'IGF-I et ont un faible niveau d'insuline circulant (133). On note également un nanisme chez ces souris et une stérilité qui peut être expliqués par les faibles taux de GH et d'IGF-I (133). En revanche, les souris homozygotes *Snell (Pit1<sup>dw</sup>)* sont plus maigres avec seulement un tiers du poids des souris sauvages à l'âge adulte (133).

Les souris *FIRKO (fat-specific insulin receptor knockout)* portent une délétion du récepteur à l'insuline spécifiquement dans le tissu adipeux blanc, rendant la signalisation à l'insuline inefficace dans celui-ci (88). Les souris *FIRKO* mâles et femelles ont vu leur durée de vie moyenne augmentée de 18% (+134 jours) (88). En plus d'avoir une durée de vie supérieure aux souris sauvages, ces modèles de souris sont plus maigres et présentent une réduction de 50 à 70% de leur masse grasseuse malgré une consommation alimentaire normale, qui se traduit par une réduction d'environ 25% de la teneur corporelle totale en TG (88). De plus, les souris *FIRKO* sont résistantes à l'obésité, ont une tolérance au glucose normale, ne présentent aucune des anomalies métaboliques associées à la lipodystrophie et sont protégées contre les changements du métabolisme qui s'installent graduellement avec le vieillissement, tels que le diabète, l'obésité, l'athérosclérose, etc... (88). Les résultats de cette étude sur la souris *FIRKO* démontrent les effets bénéfiques d'une adiposité réduite sur l'allongement de la durée de vie dans un environnement où la consommation de nourriture est normale, voire accrue par rapport au poids corporel (88).

Parmi les différents composants de la cascade de signalisation de l'insuline, un rôle de l'IGF-IR dans la longévité de la souris a également été démontré. En effet, des souris hétérozygotes KO pour le gène *IGF-IR (IGF-IR<sup>+/-</sup>)* vivent en moyenne 26% plus longtemps que leurs congénères de type sauvage (87). Plus précisément, les souris femelles *IGF-IR<sup>+/-</sup>* vivent 33% plus longtemps que les femelles de type sauvage, alors que les souris mâles présentent une augmentation de 16% de la durée de vie (87). De plus, l'étude a démontré que l'IGF-IR fonctionne dans le cerveau et le tissu adipeux de la souris adulte pour réguler la durée de vie (87). Contrairement aux modèles murins *Snell* et *Âmes*, les souris *IGF-IR<sup>+/-</sup>* à longue durée de vie ne développent pas de nanisme (87). En outre, leur métabolisme énergétique est normal, et leur absorption de nutriments, leur

activité physique, leur fertilité et leur reproduction ne sont pas affectées (87). Les souris *IGF-IR<sup>+/-</sup>* présentent également une plus grande résistance au stress oxydatif (87). Ainsi, cette étude indique que le récepteur de l'IGF-I pourrait être un régulateur central de la durée de vie des mammifères. Avec les effets de la délétion du récepteur de l'insuline dans le tissu adipeux blanc et l'hétérozygotie pour une mutation ubiquitaire dans le récepteur de l'IGF-I sur la longévité, ces études indiquent que la voie de l'insuline et de l'IGF-I peuvent toutes deux réguler la durée de vie (88) (87).

### L'Homme *Homo sapiens*.

Cette remarquable conservation tout au long de l'évolution suggère que l'altération de la signalisation dans cette voie peut également influencer la durée de vie humaine. Des preuves nouvelles et intrigantes de l'implication de la cascade insuline/IGF dans le contrôle du vieillissement et de la longévité chez l'Homme ont également été fournies (89) (90). Chez l'Homme, il est intéressant de noter que des mutations non-synonymes dans le gène *IGF-IR* sont associées à des formes extrêmes de longévité chez les individus centenaires (89). En effet, une étude sur une cohorte humaine d'origine juive ashkénaze a identifié divers polymorphismes dans le gène *IGF-IR* qui sont en corrélation avec une longévité très prolongée (89). Dans leurs cohortes de centenaires, les auteurs ont retrouvé les traits physiologiques typiques d'une inactivation partielle d'*IGF-IR*, comme une taille inférieure à la normale et des taux extrêmement élevés d'IGF-I dans le sang, entraînant une diminution de l'affinité du ligand pour l'IGF-IR (89). Les résultats suggèrent que les centenaires pourraient héberger individuellement des variations génétiques rares dans les gènes codant pour les composants de la voie de signalisation GH/IGF. Il semble donc que des mutations dans l'*IGF-IR* s'accompagnent, chez le ver comme chez l'Homme, d'un allongement de la durée de la vie. Cet article fournit des preuves solides que l'IGF1R peut être un déterminant génétique de la longévité humaine.

Une autre étude menée chez une petite population équatorienne souffrant de déficiences au niveau du récepteur de l'hormone de croissance (GHR), a montré que ces individus ont une diminution des niveaux d'insuline circulant et une meilleure sensibilité à celle-ci (90). Chez l'Homme, la sensibilité à l'insuline diminue au cours du vieillissement et l'insulino-résistance est un facteur de risque important associé à divers phénotypes pathologiques (hypertension, athérosclérose, obésité) qui affectent fortement la morbidité et la mortalité chez les personnes âgées (131). De plus, cette population semble échapper à la plupart des pathologies traditionnellement reliées au vieillissement, comme le cancer et le diabète de type II (90). Prises dans leur ensemble, cette étude illustre le rôle mécanique frappant et conservé de la signalisation IIS dans la régulation du vieillissement chez l'Homme.

Ainsi, l'inhibition de composants spécifiques de l'IIS peut améliorer de larges aspects de la santé dans une série d'organismes modèles et a le potentiel d'atténuer la sénescence fonctionnelle et les maladies liées à l'âge chez l'Homme. En conjonction avec les résultats obtenus chez les vers, la mouche et les souris, ces résultats apportent de nouvelles preuves importantes qu'au moins certains des mécanismes de contrôle

généétique de la longévité ont pu être conservés du ver aux mammifères et que la voie IIS est liée de manière causale au vieillissement dans tous les taxons.

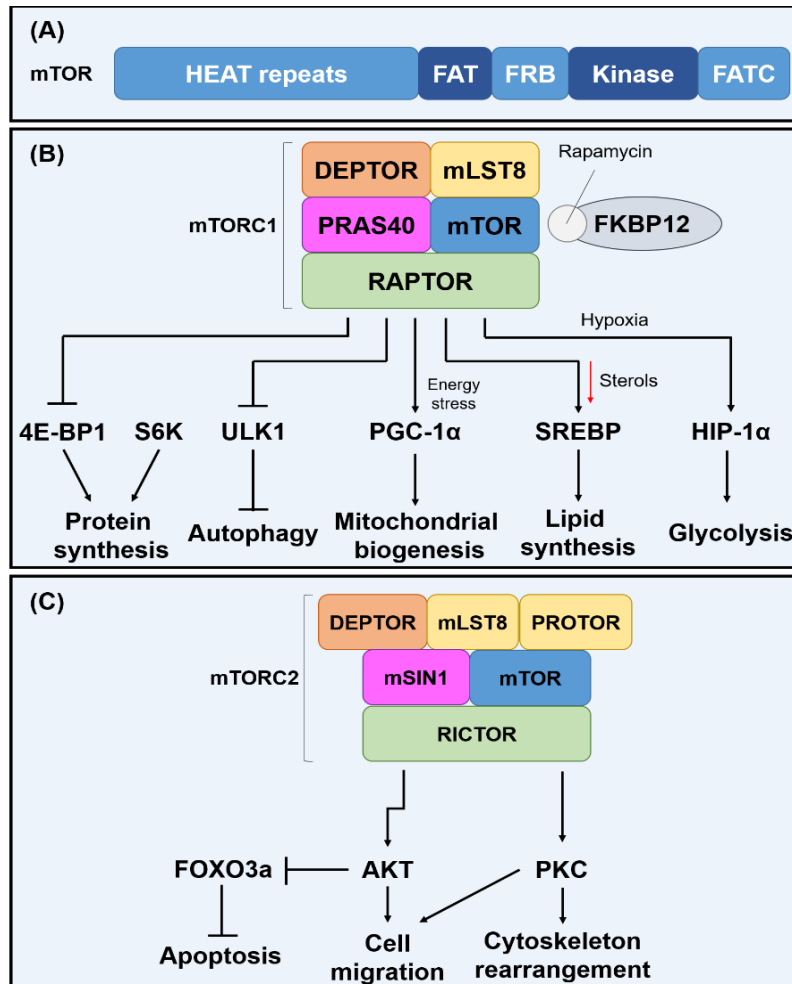
## **b. La voie de la cible de la rapamycine (mTOR).**

### **i. Définition.**

Les protéines TOR (Target Of Rapamycin), TOR1 et TOR2, ont d'abord été identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où la rapamycine qui est un antibiotique va se révéler être un puissant inhibiteur de la croissance et la prolifération cellulaire après sa liaison avec la peptidylprolyl isomérase FKBP12 (FK506-binding protein 12) (148) (149). Peu après, la protéine mTOR (mechanistic/mammalian Target Of Rapamycin) a été purifiée des cellules de mammifères et s'est révélée être la cible physique de la rapamycine (148) (149). La protéine mTOR est un polypeptide d'environ 280 kDa qui contient à leur extrémité C-terminale un domaine sérine-thréonine kinase qui est spécifique des protéines apparentées à la famille des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-related kinases (PIKK) hautement conservée chez les eucaryotes, à laquelle appartiennent les PI3K des diverses classes, ainsi que les kinases impliquées dans la détection des lésions de l'ADN, telles que l'ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), l'ATR (Ataxia- and Rad3-related) et la DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) (Fig. 12A) (148) (149). En plus du domaine kinase, mTOR contient 32 domaines HEAT (Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR), correspondant à des portions répétitives de la protéine (Fig. 12A) (148) (149). Elle contient aussi des domaines FAT (FRAP, ATM et TRRAP, en référence à trois protéines de la famille des PIKK) et FATC (FAT carboxy-terminal) communs à tous les membres de la famille PIKK et importants pour la phosphorylation des substrats par mTOR (Fig. 12A) (148) (149). De plus, mTOR possède un domaine FRB (FKBP-rapamycin binding) qui est la cible du complexe FKBP12-rapamycine (Fig. 12A) (148) (149).

Pour être active, cette protéine doit être associée à d'autres protéines au sein de complexes multi-protéiques. En effet, la protéine kinase mTOR forme la sous-unité catalytique de deux complexes multi-protéiques fonctionnellement distincts, conservés chez tous les eucaryotes et nommés mTORC1 et mTORC2, qui sont chacun impliqués dans de multiples processus biologiques (Fig. 12B) (148) (149). Lorsqu'elle est associée à la protéine RAPTOR (Regulatory associated protein of TOR) et à la mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8), mTOR forme le complexe mTORC1 (Fig. 8B) (148) (149). La RAPTOR facilite le recrutement de substrat au mTORC1, et est nécessaire pour la localisation subcellulaire correcte du mTORC1 (148) (149). Par contre, la mLST8 s'associe au domaine catalytique du mTORC1 et permet de stabiliser la boucle d'activation de la kinase (148) (149). En plus de ces trois composants de base, le complexe mTORC1 interagit aussi avec la DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) et le PRAS40 (Proline-Rich AKT Substrate of 40 kDa), des régulateurs négatifs de mTORC1 (Fig. 12B) (148) (149). Le mTORC1 est sensible au complexe FKBP12-

rapamycine, qui serait responsable en se fixant au FRB d'un encombrement stérique empêchant la mTOR de former un complexe multi-protéique fonctionnel (Fig. 12B) (148) (149). Pour former le mTORC2, la kinase mTOR interagit avec les protéines RICTOR (Rapamycin insensitive companion of TOR) et mLST8 (Fig. 12B) (148) (149). De plus, le mTORC2 s'associe aussi avec la DEPTOR, qui réprime son activité, ainsi qu'avec la mSIN1 (mammalian Stress-Activated Protein Kinase (SAPK)-Interacting Protein 1) et la PPR5/PROTOR (Fig. 12B) (148) (149). Contrairement au mTORC1, il est insensible à la rapamycine. Bien que le mTORC2 ne soit pas directement affecté par la rapamycine, une exposition chronique peut séquestrer la mTOR du mTORC2, inhibant ainsi l'assemblage de ce dernier (120) (148) (149).



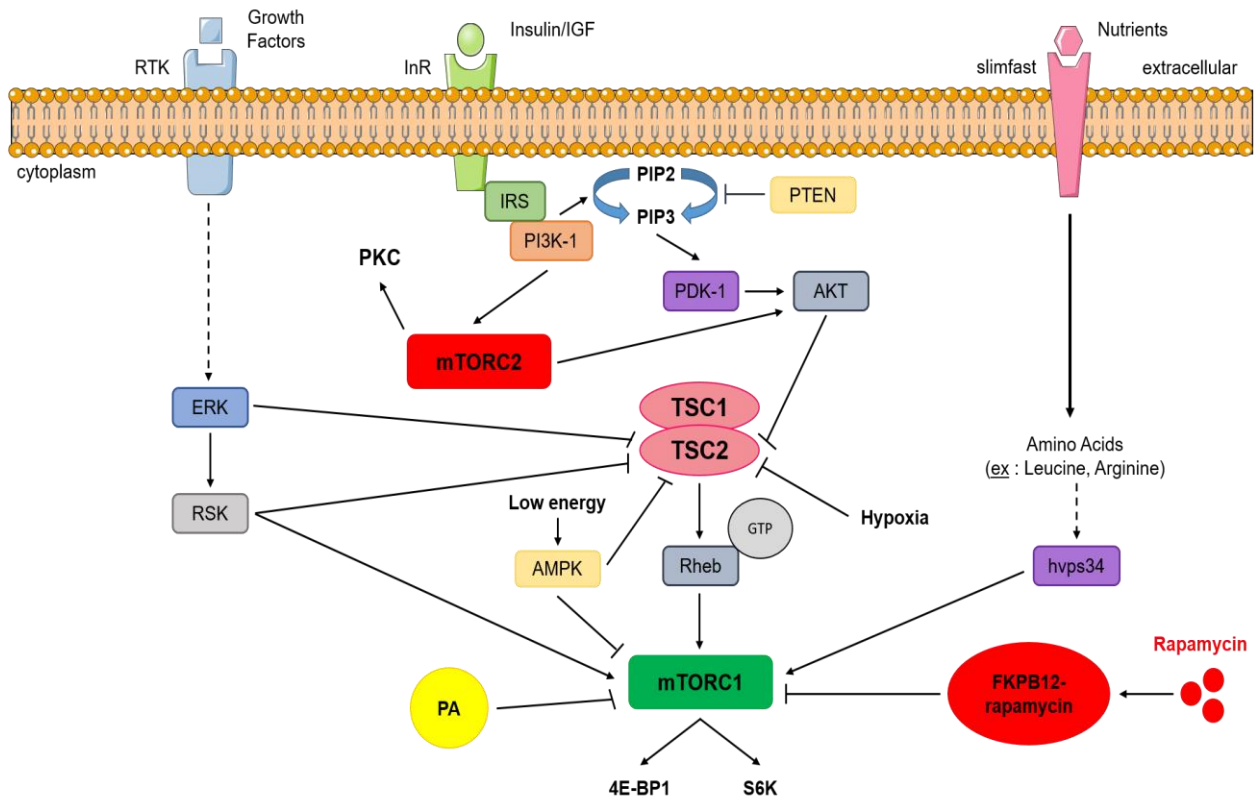
**Figure 12 – Organisation structurale des complexes mTORC1 et mTORC2.**

**(A)** La partie N-terminale de la protéine mTOR est composée de 32 domaines HEAT répétés en tandem qui sont responsables d'interactions protéiques, un domaine FAT, un domaine FRB qui est le site de liaison du complexe FKBP12 – rapamycine, le domaine kinase d'organisation classique, et un second domaine FAT en C-terminal (FATC). **(B)** Le complexe protéique mTORC1 contient les protéines RICTOR, mLST8 et PRAS40, ainsi que la protéine régulatrice DEPTOR. Le mTORC1 régule la glycolyse par l'HIF-1α, la synthèse des lipides par la SREBP, la synthèse des protéines par l'activation de la S6K ou l'inhibition de l'4E-BP1, la biogenèse mitochondriale par la PGC-1α et inhibe l'autophagie par l'ULK1. **(C)** Le complexe mTORC2 diffère par l'association avec la RICTOR et les protéines qui lui sont associées, mSIN1 et PPR5/PROTOR. De son côté, le mTORC2 inhibe le facteur de transcription FOXO3a via l'AKT, ce qui peut avoir un rôle sur la prolifération et la survie cellulaire. Le complexe régule également l'assemblage du cytosquelette de l'actine par le biais de la PKC. **4E-BP1** : eIF4E

binding protein ; **DEPTOR** : DEP domain containing mTOR-interacting protein ; **FAT** : FRAP, ATM, TRAPP ; **FKBP12** : FK506-binding protein 12 ; **FRB** : FKBP-rapamycin Binding ; **HEAT** : Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR ; **HIF-1 $\alpha$**  : Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$  ; **mLST8** : mammalian Lethal with Sec13 protein 8 ; **mSIN1** : (mammalian Stress-activated protein kinase (SAPK)-Interacting Protein 1) ; **mTOR** : mechanistic Target Of Rapamycin ; **PGC-1 $\alpha$**  : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 $\alpha$  ; **PKC** : Protéine Kinase C ; **RAPTOR** : Regulatory associated protein of TOR ; **RICTOR** : Rapamycin insensitive companion of TOR ; **S6K** : Ribosomal protein S6 kinase ; **SREBP** : Sterol regulatory element binding protein ; **ULK1** : Unc-51 like autophagy activating kinase 1. Source : Adaptée de (43) (149).

L'enzyme mTOR peut jouer différents rôles selon les protéines qu'elle active ou inhibe. Les études menées jusqu'à présent dans le monde entier ont révélé que la protéine kinase mTOR nucléarise un important réseau de signalisation eucaryote qui coordonne la croissance cellulaire en réponse à des signaux nutritifs et hormonaux, et joue un rôle fondamental dans la physiologie des cellules et des organismes (148) (149). En effet, l'activité de ce complexe est stimulée par l'insuline, les facteurs de croissance, les AA en particulier la leucine, et l'acide phosphatidique (PA) (Fig. 13) (148) (149). Le mTORC1 est aussi réprimé par le stress oxydatif et la déprivation énergétique (ratio ATP/ADP faible) par l'action de l'AMPK, un capteur clé de l'état énergétique cellulaire (Fig. 13) (148) (149). En réponse à ces signaux, le mTORC1 phosphoryle de nombreuses cibles intracellulaires, en particulier celles qui sont impliquées dans le contrôle de la traduction des ARNm et la synthèse des protéines (Fig. 13) (148) (149). Parmi elles, il y a au moins deux substrats spécifiques du mTORC1, la protéine kinase ribosomal S6 (S6K) et la protéine 4E-BP1 (eIF4E binding protein), qui est un inhibiteur du facteur d'initiation eIF4E (elongation initiator factor 4E) (Fig. 12B et 13) (148) (149). Le complexe mTORC1 favorise également la biosynthèse des lipides, participe à la régulation de l'autophagie et régule le métabolisme du glucose et la fonction mitochondriale grâce au facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$ ), ainsi qu'au coactivateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) Gamma Coactivator-1 $\alpha$ ) (Fig. 12B) (148) (149). Le complexe mTORC2 possède parmi plusieurs substrats récemment identifiés la protéine AKT, qu'elle active par phosphorylation, jouant ainsi un rôle majeur dans la prolifération et la survie cellulaire (Fig. 12C et 13) (148) (149). Enfin, le mTORC2 joue un rôle essentiel dans la structuration du cytosquelette d'actine en phosphorylant la PKC (Protéine Kinase C), qui régule divers aspects du remodelage du cytosquelette et de la migration cellulaire (Fig. 12C) (148) (149).





**Figure 13 – Ensemble des voies de signalisation autour des complexes mTORC1 et mTORC2.**

Les mTORC1 et mTORC2 sont indiqués en **vert** et en **rouge**, respectivement. L'activation de la PI3K par les facteurs de croissance mène à l'activation du mTORC2 et à l'accumulation dans la membrane plasmique de la PIP3, phospholipide important pour le recrutement et l'activation de l'oncogène AKT. Le complexe mTORC2 fonctionnel régule les kinases AKT et PKC. Une fois activée, l'AKT phosphoryle le TSC2 et inhibe son activité GAP, permettant l'activation du mTORC1 par Rheb. De plus, les kinases ERK et RSK activent le mTORC1 en phosphorylant et inactivant le TSC2. Enfin, les kinases RSK augmentent l'activité du mTORC1 en phosphorylant directement la RAPTOR. Par ailleurs, le complexe dimérique formé du TSC1 et du TSC2 est un régulateur négatif important du mTORC1, puisque son activité GAP hydrolyse la molécule de GTP liée à la protéine Rheb activée, où elle interagit avec la mTOR et active spécifiquement la signalisation mTORC1. Lorsque les niveaux énergétiques de la cellule sont faibles, l'AMPK diminue l'activité du mTORC1 en phosphorylant le TSC2 et la RAPTOR. De son côté, le mTORC1 est également sensible à la disponibilité en nutriments, notamment en AA, qui l'activent indépendamment du complexe TSC1/2. En effet, les AA activent directement le mTORC1 grâce à une PI3K de classe III, hVps34. En outre, l'hypoxie diminue l'activité du mTORC1. Enfin, l'acide phosphatidique (PA) lie le domaine FRB de mTOR et est un inhibiteur important du mTORC1. **AMPK** : AMP-activated protein kinase ; **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase ; **GAP** : GTPase Activating Protein ; **GTP** : Guanosine triphosphate ; **hVps34** : human vacuolar protein sorting 34 ; **PA** : acide phosphatidique ; **Rheb** : Ras homologue enriched in brain ; **RSK** : p90 Ribosomal S6 Kinase ; **RTK** : Récepteur à activité Tyrosine Kinase ; **TSC1/2** : Tuberous Sclerosis Complex gene 1/2. Source : Adaptée de (149).

## ii. La voie mTOR dans le processus de vieillissement.

La première indication que la mTOR régule le vieillissement est venue d'études menées chez la *S. cerevisiae*, dans lesquelles il a été constaté que la délétion du gène codant pour l'orthologue de la *S6K* chez la

levure, *SCH9*, entraînait un doublement de la durée de vie chronologique de la levure, définie comme la durée pendant laquelle les cellules en phase stationnaire restent viables (43). Peu après, on a montré que le mTORC1 affectait la longévité, en constatant que la mutation ou l'inactivation de la *mTOR* par un ARN interférent (ARNi ou RNAi en anglais) ou du composant *RAPTOR* du complexe mTORC1 (*DAF-15*) pouvaient prolonger la durée de vie du *C. elegans* (149) (150). Des études génétiques ultérieures ont montré que la réduction de la signalisation de TOR favorise également la longévité chez la drosophile (151), ainsi que chez les souris (120). De même, la surexpression de *dtSC1* et *dtSC2*, deux inhibiteurs de mTOR, spécifiquement dans le corps gras est suffisant pour prolonger la durée de vie des mouches (151). En outre, une série d'études a montré que la rapamycine, qui inhibe spécifiquement l'activité de mTORC1, peut prolonger la durée de vie de la levure, des vers, des mouches et est l'un des médicaments les plus étudiés pour augmenter la durée de vie des souris, établissant fermement le mTORC1 comme un régulateur central de la longévité, conservé au cours de l'évolution (43) (120). En effet, une récente méta-analyse de 29 expériences sur la durée de vie des souris utilisant la rapamycine a montré que ce médicament prolongeait fortement la durée de vie, mais que l'ampleur de l'effet variait en fonction du sexe, avec des effets plus importants chez les femelles que chez les mâles, et du fond génétique (152). Cependant, une autre étude sur des souris a montré que la rapamycine prolonge effectivement la longévité grâce à l'inhibition du mTORC1, mais pouvait aussi profondément altérer l'homéostasie du glucose suite à une perturbation de la signalisation du mTORC2 (120). En outre, il a aussi été démontré que la rapamycine a des effets anti-inflammatoires dans de multiples complexes pathologiques (maladies rénales chroniques, plaques d'athérome, infection pulmonaire, etc...) et qu'une inhibition du mTORC1 pourrait ralentir le développement de multiples pathologies reliées à l'âge en réduisant l'inflammation (43). En conséquence, la rapamycine est actuellement le seul traitement pharmacologique dont il est prouvé qu'il prolonge la durée de vie de tous ces organismes modèles.

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour définir les mécanismes par lesquels l'inhibition du mTORC1 améliore la longévité. Plusieurs processus régulés par le mTORC1 sont susceptibles de contribuer aux effets de l'inhibition du mTORC1 sur la longévité. En effet, les différentes cibles en aval de la voie lui permettent de moduler la traduction de l'ARNm, l'autophagie et le métabolisme mitochondrial. Par ces effets, le complexe est donc considéré comme un régulateur central de la longévité chez les eucaryotes. Plusieurs sources de données ont dévoilé que la suppression de mTOR a pour effet de réduire la traduction de l'ARNm en réduisant l'accumulation de stress protéotoxique et oxydatif et de ce fait de ralentir le vieillissement, ce qui concorde avec l'observation selon laquelle la perte du substrat S6K du mTORC1 prolonge également la durée de vie des mammifères (149). Une autre possibilité est que l'inhibition du mTORC1 ralentit le vieillissement en activant l'autophagie, qui aide à éliminer les constituants cytoplasmiques aberrants ou endommagés, tels que les mitochondries, dont l'accumulation contribuent au vieillissement cellulaire et tissulaire ainsi qu'aux maladies reliées au vieillissement (43). Ces deux phénomènes sont très étudiés pour prolonger la durée vie en augmentant la protéostase (43). Un autre rapport a également montré que l'inhibition du mTORC1 entraîne une plus grande respiration mitochondriale, augmentant ainsi la durée de vie (43). De

même, les souris qui n'ont pas d'activité mTORC1 dans le tissu adipeux présentent également une respiration mitochondriale accrue (43). En outre chez les souris, l'inhibition de la signalisation par mTOR diminue aussi globalement l'inflammation et l'incidence de cancer (43). De plus, la longévité est régulée positivement ainsi que la santé globale avec l'âge (43). Enfin, un autre modèle suggère que l'épuisement des cellules souches adultes dans divers tissus joue un rôle central dans le vieillissement de l'organisme, et que l'inhibition de mTOR stimule la capacité d'auto-renouvellement des CSH et CSI chez la souris (43). Les résultats obtenus chez ces nombreux modèles d'études sont très prometteurs pour leur transposition chez l'humain. En effet, l'inhibition du mTORC1 ralentit le vieillissement probablement par sa capacité unique à réguler une si grande variété de fonctions cellulaires clés, prolonge la durée de vie et retarde l'apparition d'un large éventail de maladies liées à l'âge chez de nombreux organismes.

### **c. La voie de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK).**

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), hautement conservée à travers l'évolution, joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme énergétique cellulaire, tissulaire et à l'échelle de l'organisme (153). En réponse aux épisodes de stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie, l'AMP (Adénosine MonoPhosphate) se fixe sur la protéine kinase, l'activant et entraînant la phosphorylation de plusieurs enzymes métaboliques, facteurs de transcription et co-activateurs qui favorisent les voies cataboliques productrices d'ATP (oxydation des AG, glycolyse) et inhibent les voies biosynthétiques consommatrices d'ATP (synthèse des protéines du cholestérol et des AG) (153). Par exemple, il a été démontré que l'AMPK phosphoryle directement le TSC2 ou la protéine Raptor, partenaire de liaison du complexe mTORC1, inhibant ainsi l'activité de la voie mTOR (149). Par l'action de l'AMPK, l'organisme est capable de coordonner la régulation de différentes voies métaboliques contrôlant la prise en charge, l'utilisation et l'oxydation des molécules génératrices d'énergie (glucose et lipides), dépendamment du niveau [AMP]/[ATP] (153). Elle inhibe également la croissance et la prolifération cellulaire en déclenchant des événements de phosphorylation qui inhibent la voie mTOR (153). La protéine kinase est activée par des niveaux d'AMP élevés et inhibée par des concentrations élevées d'ATP (153). Elle est donc directement sous le contrôle du rapport [AMP]/[ATP], qui est lui-même un indicateur de la quantité d'énergie disponible dans les cellules (153).

La majorité des études de longévité concernant l'AMP ont montré qu'une surexpression de la protéine est suffisante pour prolonger la durée de vie et améliorer la santé globale des organismes modèles (154). Chez le *C. elegans*, l'augmentation de la sous-unité catalytique  $\alpha$  de l'AMPK, AAK-2, induit un effet positif significatif à la fois sur la longévité et sur la santé globale des animaux en vieillissement (154). De plus, la délétion du gène *aaak-2* inhibe les effets positifs de la RC sur la longévité des vers mutants (154). Chez les mouches, il a été

signalé que la surexpression de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK dans le corps gras, les muscles, les neurones ou l'intestin prolonge significativement la durée de vie (155) (156). En outre, la régulation positive de l'AMPK dans le système nerveux central de la drosophile induit une autophagie à la fois dans le cerveau et dans l'intestin (156). L'induction de cette autophagie entraîne une amélioration de l'homéostasie intestinale au cours du vieillissement et une extension de la durée de vie (156). Ceci est lié à une altération de la signalisation de l'insuline traduite par une diminution des niveaux de Dilp2 dans le cerveau (156).

Plusieurs études faites avec l'activateur pharmacologique de l'AMPK, la metformine, ont rapporté que ce dernier est reconnu pour prolonger la durée de vie, retarder le déclin fonctionnel relié au vieillissement et limite l'apparition de maladies associées à l'âge chez des vers et des souris non-diabétiques (157) (117). La metformine est un médicament antidiabétique largement prescrit qui semble cibler un certain nombre de mécanismes moléculaires liés au vieillissement comprenant une diminution des niveaux d'insuline, une baisse de la signalisation de l'IGF-I, l'inhibition de mTOR, l'inhibition du complexe mitochondrial I dans l'ETC et la réduction de la production endogène d'ERO, l'activation de l'AMPK, et une réduction des dommages causés à l'ADN (153). Une étude a démontré que la metformine promeut un vieillissement en bonne santé des nématodes, en ralentissant l'accumulation de lipofuscine, en prolongeant la durée de vie moyenne et en augmentant l'activité locomotrice de manière dose-dépendante (157). En outre, les nématodes traités à la metformine présentent de faibles réserves de graisses et une fécondité réduite (157). Plusieurs études biochimiques et physiologiques soutiennent que la metformine agirait par un mécanisme qui partage les caractéristiques génétiques et phénotypiques de la RC, mais indépendant de la voie de signalisation de l'insuline (157). Une étude récente a montré que des cohortes de souris mâles ayant reçues une alimentation standard supplémenté de metformine ont vu leur espérance de vie augmenté de 4 à 6% (117). Le traitement à la metformine a entraîné une amélioration des performances physiques, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et la réduction des niveaux de LDL et de cholestérol sans diminution de l'apport calorique (117). Au niveau moléculaire, la metformine a augmenté l'activité de l'AMPK et a renforcé la protection anti-oxydante, entraînant une réduction de l'inflammation chronique et de l'accumulation des dommages oxydatifs, ce qui pourrait contribuer à la durée de vie et à la santé des modèles animaux (117). Cependant toutes les études n'ont pas montré des effets similaires de la metformine sur la durée de vie ou la santé. L'administration de metformine à la drosophile a entraîné une forte activation de l'AMPK et une réduction des réserves lipidiques, mais n'a pas augmenté la durée de vie (158). Il est possible que la dose de metformine utilisée dans cette étude soit toxique. En effet en utilisant une dose dix fois supérieure à celle qui s'est avérée bénéfique chez les souris, la mortalité a augmenté (117).

### 3.2.2. Des exemples de gènes individuels qui favorisent la longévité.

Pendant longtemps, le vieillissement n'a pas été considéré comme un processus biologique pouvant être régulé. A l'époque, il était communément admis que le vieillissement était irréversible et dû à une usure généralisée de l'organisme. Cependant, cette vision a été remise en question par des études génétiques sur de nombreux organismes qui montrent que le vieillissement est un processus multifactoriel. Bien que de nombreux facteurs environnementaux contribuent aux processus de vieillissement chez les organismes, le vieillissement présente également une forte composante génétique (38). Effectivement, la rapidité et l'intensité du processus de vieillissement sont sous la dépendance d'interactions étroitement régulées entre des facteurs génétiques et environnementaux.

Il est bien établi que la longévité est influencée par des gènes et des voies biochimiques hautement conservées au cours de l'évolution des espèces (36). En effet, il est connu depuis longtemps que certaines mutations peuvent entraîner un vieillissement prématuré et rapide. Depuis peu, les chercheurs s'intéressent également aux mutations capables d'accroître la longévité des organismes (159). Plusieurs études ont permis d'établir un lien important entre le vieillissement, la longévité et la génétique. A ce jour, plusieurs mutations d'un gène unique visant à prolonger la durée de vie ont été identifiées et caractérisées chez divers organismes. Quelques-uns de ces gènes seront examinés dans cette partie.

#### a. *methuselah* (*mth*), le premier gène de longévité chez la drosophile.

Une mutation hypomorphique (réduction de la fonction du gène sans l'éliminer) dans le gène *methuselah* (*mth*) a permis à des mouches de vivre en moyenne 35% plus longtemps (160). Or, des mutations nulles tuent les mouches avant même qu'elles n'atteignent l'âge adulte, indiquant qu'une certaine activité de *mth* est essentielle pour un développement réussi. De plus, cet allongement de la durée de vie s'accompagne également d'une résistance à diverses formes de stress, dont la famine, les températures élevées et le paraquat (160). Alors que près de 90% des mouches sauvages étaient mortes au bout de 48 heures, plus de 50% des mouches mutantes *mth* étaient encore en vie après l'ajout de paraquat dans l'alimentation (160). Ainsi, les mutants *mth* semblent avoir développés une capacité plus élevée de défense contre les radicaux libres. Ils ont ensuite testé l'exposition à une température élevée. De même, les mutants *mth* présentent une augmentation de la thermotolérance accompagnée d'une élongation de la durée de vie par rapport aux animaux témoins (160). Pour le test de jeûne, les mouches mutantes *mth* ont montré une augmentation de plus de 50% de la durée de vie moyenne par rapport aux contrôles (160). Cependant pour ce dernier test de résistance au stress (jeûne), les femelles étaient systématiquement plus résistantes que les mâles, ce qui met en avant un dimorphisme sexuel (160). En plus de ses propriétés améliorant la longévité, la mutation dans le gène *mth* permet

de préserver la fonction des cellules souches avec l'âge (161). En effet, l'activité des cellules souches est considérablement altérée au cours du vieillissement due à une accumulation des dommages, et que ce ralentissement est en corrélation avec une réduction du nombre de cellules (3). Par conséquent, il a été suggéré que la mutation du gène *mth* permet de retarder le vieillissement chronologique, tout en prolongeant la durée de vie de l'organisme.

La séquence protéique de *mth* a montré une homologie avec une variété de récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), qui se lie à la guanosine triphosphate (GTP). Les RCPG sont des protéines membranaires ayant une structure à sept domaines transmembranaires chargées de reconnaître des messages externes (lumière, odeurs, molécules du goût, etc...) ou des signaux intercellulaires (hormones, neurotransmetteurs, etc...). Ils sont impliqués dans un éventail d'activités biologiques, notamment la neurotransmission, la physiologie des hormones, la réponse aux médicaments et la transduction du signal. Il est alors suggéré que *mth* est un RCPG impliqué dans la modulation de la réponse au stress et du vieillissement biologique. Ainsi, il est supposé que l'organisme utiliserait des voies de transduction du signal pour moduler la réponse au stress et la durée de vie (160). Plus tard, une étude a rapporté l'identification et la caractérisation de deux ligands peptidiques à *mth* codés par le gène *stunted (sun)*, SunA et SunB, et a révélé que le silençage de *sun* imite le phénotype de perte de fonction partielle de *mth*. Effectivement, les mouches présentant des mutations dans le gène codant pour ces ligands montrent une augmentation de la durée de vie ainsi qu'une résistance accrue à divers stress (162). Ainsi, le système sun - *mth* serait impliqué dans le contrôle du processus de vieillissement. Récemment, il a été démontré qu'une expression réduite de *mth* dans les cellules productrices d'insuline (IPC) du cerveau de la mouche est suffisante pour prolonger la durée de vie et améliorer la résistance au stress oxydatif (163). De plus, la surexpression de *mth* dans ces mêmes cellules a des effets phénotypiques similaires à une expression réduite (163). La signalisation réduite de *mth* inhibe également la sécrétion d'insuline (Dilp2 et Dilp5) des IPC vers les tissus périphériques, ce qui conduit à son tour à une réduction globale de la voie IIS (163). Étant donné le rôle conservé de la voie IIS dans le vieillissement et la longévité, ces résultats pourraient aider à mieux comprendre le mécanisme d'action de *mth* dans le vieillissement des mouches adultes. D'autres travaux ont montré que *mth* et son ligand *sun* sont nécessaires à la croissance (164). En effet, l'inhibition de *mth* entraîne une réduction de la taille corporelle des larves lorsqu'elle est conduite dans les IPC, un phénotype largement observé chez les mouches avec une signalisation IIS réduite (164).

### **b. *Indy*, un gène associé à une longévité exceptionnelle.**

Des chercheurs ont montré qu'une extension optimale de la durée de vie est observée lorsque l'expression du gène *Indy* (« *I'm not dead yet* ») est diminuée de 25 à 75% par rapport à la normale dans des conditions d'alimentation normales ou riches en calories (165). Il a été démontré que plusieurs lignées indépendantes de drosophile avec une mutation dans le locus *Indy* ont causé une extension considérable de 40 à 80% de la durée de vie moyenne des mouches (d'~37 à ~70 jours) (165). De plus contrairement aux altérations

associées à une prolongation de la durée de vie, les mutations sur le gène *Indy* ne paraissent pas compromettre la qualité de vie des mouches (165). Par exemple, l'une des étapes physiologiques du vieillissement chez les mouches est l'apparition de l'infertilité chez les femelles. Or, les femelles *Indy* à longue durée de vie ont continué à produire un plus grand nombre de descendants sur une plus longue période que les mouches témoins (165). Ainsi, les mouches mutantes *Indy* s'alimentent normalement et gardent une activité physique et une fécondité normales (165).

Des études ont indiqué que le gène *Indy* chez la mouche et son homologue chez les mammifères (*mIndy* ou encore SLC13A5) présentent des similarités dans leur séquence et ont ainsi prédit que la protéine *Indy* est un transporteur transmembranaire d'une variété d'intermédiaires du cycle de Krebs avec une plus grande affinité pour le citrate, mais peut également transporter le succinate, l'oxaloacétate, le fumarate et l' $\alpha$ -cétoglutarate (165). De ce fait, *Indy* serait un membre de la famille des transporteurs SLC13A, qui est important dans le métabolisme intermédiaire de l'organisme. Chez les mouches adultes, *Indy* serait principalement exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules du corps gras, de l'intestin moyen et des œnocytes, des tissus considérés comme les principaux sites du métabolisme intermédiaire chez la drosophile et importants pour l'absorption et le stockage métabolique des nutriments (165).

En se basant sur ces résultats, il est suggéré que la mutation du gène *Indy* peut affecter le processus de vieillissement et réguler la durée de vie par un mécanisme qui rappelle la RC (165) (166) (167). Or, on sait qu'une RC modérée, qui est une manipulation environnementale, est associée à une prolongation de la durée de vie et un retard dans l'apparition des symptômes liés à l'âge chez diverses espèces (168). En effet, les mutants *Indy* à longue durée de vie manifestent de nombreux changements physiologiques et comportementaux qui sont couramment observés chez les animaux à longue durée de vie placés dans des conditions à faible teneur calorique (RC). Les mouches présentent notamment une altération de la voie de signalisation de l'insuline, du stockage des lipides, une diminution de la prise de poids, des changements dans le métabolisme glucidique, une production d'ERO mitochondriales réduite, une sensibilité accrue à la famine, ainsi qu'une augmentation de l'activité physique spontanée (166) (167). De même, il a été démontré que le contenu calorique du régime alimentaire de la mouche affecte les niveaux d'ARNm du gène *Indy* en montrant une réduction de l'expression d'*Indy* pendant une RC et aucune prolongation de la longévité lorsque les mouches mutantes *Indy* ont été élevées sur un milieu nutritionnel pauvre en calories (165) (166) (167). Ainsi, *Indy* et la RC interagissent pour affecter la longévité et une diminution du taux d'expression du gène *Indy* peut induire un état de type RC qui confère une prolongation de la durée de vie.

Comme évoqué plus haut, *Indy* est un transporteur du citrate et son activité de transport influence donc directement les événements en aval liés au métabolisme du citrate. Le citrate cytoplasmique joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique de tous les organismes vivants. Lorsque les niveaux de citrate cytoplasmique sont élevés, la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation des AG sont inhibées, alors que la voie de biosynthèse des AG est fortement activée (166) (167). Le citrate cytoplasmique est le principal précurseur pour la synthèse des AG, du cholestérol, des TG et des LDL. Il est suggéré que les changements physiologiques observés chez

les mutants *Indy* sont dus à une modification dans la disponibilité du citrate cytoplasmique, ce qui a un impact direct sur la production d'énergie du cycle de Krebs (ATP). En effet, une réduction de l'expression d'*Indy* entraîne une diminution des niveaux de citrate cytoplasmique, ce qui provoque une diminution de la synthèse des TG, des AG et une réduction de la gluconéogenèse, mais par contre une augmentation de la  $\beta$ -oxydation. De plus, une réduction dans le transport du citrate induit une diminution de la production d'ATP, ce qui active la voie de l'AMPK. Cette dernière activée favorise la biogenèse mitochondriale en augmentant la transcription de *dPGC-1*, un co-activateur transcriptionnel mitochondrial (167). Par conséquent, les travaux récents réalisés chez les vers, les mouches et les souris ont démontré qu'une mutation dans le locus *Indy* crée un état métabolique similaire à une RC et est associée à une durée de vie plus longue et plus saine en affectant la production d'énergie.

### c. Les *sirtuines*, une famille de gènes déterminants pour la longévité.

Les sirtuines forment une famille de protéines à activité désacétylase dépendantes au NAD<sup>+</sup> hautement conservée des bactéries aux mammifères, qui sont connues pour participer à la régulation de divers processus cellulaires, tels que l'inflammation, le métabolisme, la biogenèse des mitochondries, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'apoptose et la longévité (101). Les premières études mettant en lumière l'implication des sirtuines dans le vieillissement ont été faites chez la levure *S. cerevisiae* en sur-exprimant la protéine *Sir2* (169). L'étude a montré que des copies supplémentaires de la *Sir2* prolongent la durée de vie de la levure de 30% en empêchant la formation et l'accumulation d'ADN ribosomiaux (ADNr) extra-chromosomiques circulaires, une des causes du vieillissement répliatif de la levure (169). Après cette découverte avec la levure, plusieurs autres équipes de recherche ont tenté de répliquer ces résultats dans d'autres organismes modèles. Contrairement à la levure, les organismes multicellulaires ont plus d'une sirtuine dans leur génome. Le *C. elegans* possède quatre sirtuines (*Sir-2.1*, *Sir-2.2*, *Sir-2.3* et *Sir-2.4*), où la *Sir-2.1* est la plus similaire à la *Sir2* de levure. Le génome de la drosophile contient cinq sirtuines, nommées *dSir1*, *dSir2*, *dSir4*, *dSir6* et *dSir7*, dont la *dSir2* est l'orthologue de la *Sir2*. Chez le nématode et la drosophile, la surexpression du gène orthologue à la *Sir2*, respectivement la *Sir-2.1* et la *dSir2*, produit les mêmes effets sur la longévité de ces organismes (170) (171). Ces derniers résultats ont été contredits à quelques reprises dans la littérature, il semble que les effets initiaux observés seraient en réalité plus modestes et que les effets sur la longévité seraient strictement reliés au dosage de surexpression. En effet, une étude a constaté que la surexpression de la *dSir2* prolonge la durée de vie des mouches de manière dose-dépendante (171). Lorsque l'expression de la *dSir2* est augmentée de manière modérée (environ deux à cinq fois plus que la normale), la durée de vie est prolongée (171). De même, une expression inférieure à cette plage prolonge également la durée de vie. Cependant, des niveaux plus élevés de la *dSir2* diminuent la durée de vie et peuvent induire une cytotoxicité, qui se manifeste par une expression accrue de la phosphatase *puckered* (*puc*), une cible de la voie de signalisation JNK, et l'induction de *dnaJ-H* (171). Le locus génétique de la *dSir2* chevauche partiellement celui d'un gène qui est transcrit dans la direction opposée, l'homologue du



gène *dnaJ* (*dnaJ-H*) (171). Bien que la fonction spécifique de DNAJ-H n'ait pas été démontrée, il présente une homologie avec la famille des protéines de choc thermique 40, qui sont connues pour être impliquées dans le pliage, la traduction et la dégradation des protéines (171). Cette toxicité cellulaire n'est pas surprenante étant donné les nombreux partenaires connus de la *dSir2* et de ses orthologues, dont beaucoup sont des facteurs de transcription clés associés à des aspects importants de la survie et du métabolisme des cellules, alors que la Sir2 de la levure était à l'origine censée désacétyler les histones. Parmi les plus importants, on trouve le suppresseur de tumeur p53, les membres de la famille FOXO, et le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, tous des régulateurs clés de la mort et de la survie des cellules (171). Elle est également impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire via la désacétylation et l'activation du co-activateur transcriptionnel mitochondrial PGC-1 $\alpha$  (171).

Contrairement aux trois derniers organismes modèles, les mammifères possèdent sept membres de la famille des sirtuines (SIRT-1 à SIRT-7), dont la SIRT-1 ayant la plus forte homologie de séquence avec la Sir2 de levure. Ces sirtuines sont exprimées dans des tissus spécifiques et ont des activités enzymatiques différentes (101). Plusieurs études chez la souris ont permis de déterminer l'importance du gène, pas seulement dans la longévité, mais également dans le processus de vieillissement en tant que tel. En plus de moduler positivement la longévité, la surexpression de la *SIRT-1* parvient aussi à améliorer plusieurs paramètres métaboliques et retarder le processus de vieillissement (172). Notamment, une étude a montré que des souris transgéniques sur-exprimant la *SIRT-1* de manière ubiquitaire présentent certains phénotypes similaires à ceux des souris soumises à un régime alimentaire à faible teneur en calories : elles sont plus maigres que les souris témoins, plus actives sur le plan métabolique, présentent un retard de reproduction, des taux de cholestérol sanguin plus faibles, une réduction des niveaux d'insuline et de glucose dans le sang, une amélioration de la fonction physique et sont plus tolérantes au glucose (172). De même, d'autres travaux démontrent que la SIRT-1 module aussi la sénescence cellulaire via la désacétylation de diverses molécules de signalisation participant à divers processus biologiques, telles que FOXO, NF- $\kappa$ B et p53, modifiant ainsi l'expression de nombreux gènes (101).

Bien que la SIRT-1 soit le membre de la famille des sirtuines le plus étudié jusqu'à ce jour, de plus en plus d'études se tournent vers les autres membres de la famille pour explorer la voie des sirtuines. Le sixième membre de la famille semble être impliqué dans le processus de vieillissement, puisque des expériences avec des souris inactivées pour ce gène montrent un vieillissement accéléré dans certains tissus (173). De plus, les souris transgéniques sur-exprimant la *SIRT-6* montrent une augmentation de la durée de vie chez les mâles, mais pas chez les femelles (173). Chez la drosophile, la surexpression de la *dSir4* (localisée dans les mitochondries) a été signalée comme prolongeant la durée de vie et augmentant la résistance à la famine, alors qu'une carence en *dSir4* a entraîné une sensibilité à la famine et une diminution de la fertilité, de l'activité locomotrice et de la durée de vie (174). Ainsi, toutes ces études ont démontré une amélioration de la qualité de vie et de la santé à long terme dans différents modèles animaux suite à l'activation des membres de la famille, ainsi qu'une extension de la durée de vie. Les sirtuines sont alors considérées comme des facteurs essentiels qui

retardent le processus de vieillissement et prolongent la durée de vie de l'organisme grâce à la régulation de divers processus cellulaires.

#### **d. Dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif et vieillissement.**

Les mitochondries sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques importants, notamment le métabolisme, la signalisation, l'apoptose, le cycle cellulaire et la différenciation (175). En raison de leur importance dans la physiologie cellulaire, les défauts des mitochondries sont associés à diverses maladies humaines (7) (175). Comme mentionné dans la section 1.2.6 de l'introduction, la fonction mitochondriale est depuis longtemps soupçonnée réguler, au moins en partie, le processus de vieillissement (7) (175). Plusieurs études ont montré des résultats supportant le fait qu'une cause potentielle du vieillissement est l'accumulation progressive de mitochondries dysfonctionnelles et de dommages oxydatifs avec l'âge survenant chez plusieurs espèces (3) (7) (175). D'après cette théorie, avec le vieillissement des cellules et des organismes, l'efficacité de l'ETC tend à diminuer, ce qui augmente la fuite d'électrons et réduit la génération d'ATP (7) (175).

Les mitochondries, au travers de l'activité de l'ETC (composée des complexes I à IV, localisés dans la membrane interne) et de l'ATP synthase, produisent une grande quantité de l'énergie sous forme d'ATP dont les cellules ont besoin pour fonctionner. Etant donné que les mitochondries utilisent l'O<sub>2</sub> pour convertir les calories alimentaires en énergie utilisable, elle est également considérée comme une des principales sources d'ERO dans la cellule (7). L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), l'une des principales espèces radicalaires des mitochondries, est généré principalement comme sous-produit de la respiration oxydative normale dans les mitochondries par les complexes I et III de l'ETC (7). Le superoxyde est très instable et est converti en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui en présence de métaux de transition réduits, peut donner un radical hydroxyle (•OH) hautement réactif, pouvant être à l'origine d'une oxydation délétère des constituants cellulaires (7). Il peut aussi réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour donner l'anion peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), un agent oxydant et nitrant puissant très toxique (7). Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources d'ERO intracellulaire, elle est surtout la principale cible. Les ERO peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. En effet, ces dérivés pouvant être toxiques pour l'organisme sont capables d'inhiber l'ETC et d'endommager différents composants mitochondriaux, qui sont censés accélérer le vieillissement (7).

Sous des conditions physiologiques normales, les ERO sont utilisés par les cellules comme seconds messagers inter- et intracellulaires (7). De cette façon, ils participent à plusieurs processus cellulaires, notamment la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la sénescence (7). De plus, ces facteurs vont également participer aux processus inflammatoires et de croissance de l'organisme (7). L'utilisation de ces dérivés toxiques dans des processus essentiels diminue ainsi leur concentration dans les cellules, et donc le taux de dommages qu'ils peuvent engendrer. En revanche, l'excès d'ERO peut entraîner des altérations irréversibles dans la cellule (7). Il a été démontré que le taux de production d'ERO augmente avec l'âge (3) (7). Ainsi, le vieillissement et les maladies dégénératives qui lui sont associés peuvent être induits par les effets délétères des ERO (7). Du fait

de la production de radicaux libres inhérente au fonctionnement de l'ETC mitochondriale, les protéines, les lipides et l'ADN des mitochondries accumulent des dommages oxydatifs au cours du vieillissement, avec notamment une accumulation de mutations et de délétions dans l'ADNmt qui code pour des gènes essentiels à la production d'énergie, l'oxydation des protéines mitochondriales et des modifications dans la composition lipidique des membranes mitochondriales (3) (7). Ces dommages seraient, en retour, responsables d'une déstabilisation de l'organisation macromoléculaire des complexes de l'ETC entraînant un déclin de l'ETC, d'une surproduction mitochondriale de radicaux libres, d'une altération du métabolisme énergétique mitochondrial due à une réduction de la vitesse maximale de consommation d'oxygène, et du déclenchement du processus d'apoptose des cellules (3) (7). Ainsi s'installe un cercle vicieux, où la combinaison d'une augmentation des dommages et d'une réduction du renouvellement des mitochondries, due à une biogenèse plus ralentie, peut contribuer au processus de vieillissement.

### **i. Une respiration mitochondriale réduite favorise la longévité.**

De nombreuses études ont montré que les mitochondries sont impliquées dans le processus de vieillissement de plusieurs façons (7). Vu qu'elles sont essentielles à de nombreux processus biologiques, il n'est pas surprenant qu'un dysfonctionnement mitochondrial grave entraîne la létalité, un arrêt du développement ou un vieillissement prématuré (7) (175). Cependant, quelques études ont montré qu'une légère inhibition de la respiration mitochondriale augmente la durée de vie de nombreuses espèces (176) (177) (178). En effet, un certain nombre d'études ont montré que la perturbation génétique de la fonction mitochondriale par des mutations dans l'ADNmt ou des gènes codant pour les composants de l'ETC mitochondriaux a été signalée comme affectant la durée de vie dans divers organismes modèles allant du *C. elegans* à la souris (176) (177) (178).

Chez le *C. elegans*, il a été démontré que la durée de vie de l'organisme est augmentée par un certain nombre de mutations dans les composants de l'ETC mitochondriale (7) (175) (176). Notamment, des études ont répertorié que des mutations dans les gènes *clk-1*, *isp-1* et *nuo-6* entraînent une augmentation de la durée de vie des nématodes (7) (175) (176). Le gène *clk-1* code une hydroxylase mitochondriale nécessaire à la biosynthèse de l'ubiquinone, un transporteur d'électrons de l'ETC (7) (175). De ce fait, les mutants *clk-1* présentent des défauts dans la respiration mitochondriale dus à des défauts de transfert d'électrons du complexe I au complexe III de l'ETC, qui nécessite l'ubiquinone (7) (175). Concernant les gènes *isp-1* et *nuo-6*, ils codent pour un composant du complexe III de l'ETC et pour une NADH déshydrogénase mitochondriale, respectivement (7) (175) (176). En outre, un certain nombre d'études ont montré que l'inactivation des gènes codant pour les sous-unités des complexes respiratoires prolonge également la durée de vie des nématodes et cet effet est conservé chez la drosophile (7) (175) (177). Historiquement, il était supposé que les ERO produites par les mitochondries provoquent des dommages oxydatifs dus à l'âge et raccourcissent la durée de vie des organismes. Cependant, les mutants *clk-1* et *isp-1* présentent des niveaux élevés d'ERO (179). Or, cette augmentation dans les niveaux d'ERO semble être à la fois nécessaire et suffisante pour favoriser la longévité (179). Il est

constaté que de légères augmentations dans les niveaux d'ERO peuvent déclencher des mécanismes qui ralentissent le vieillissement, vraisemblablement via des changements dans l'expression des gènes (179). Plus précisément, il a été démontré que la longévité médiée par les gènes *clk-1* et *isp-1* nécessite l'activation d'HIF-1, un facteur de transcription hautement conservé qui active les gènes qui favorisent la survie pendant l'hypoxie, en réponse à de fortes concentrations d'ERO suite à une diminution de l'activité mitochondriale (179).

Cet allongement de la durée de vie par l'inhibition de la respiration mitochondriale est conservé au cours de l'évolution. En effet, des travaux ont montré que l'inhibition par un ARNi de l'expression de plusieurs gènes codant pour les sous-unités du complexe I (CG9172 et CG9762), du complexe III (CG17856), du complexe IV (CG18809) et du complexe V (CG5389) de la chaîne respiratoire mitochondriale a augmenté la durée de vie moyenne des mouches (177). Plus précisément, pour deux d'entre eux, CG9172 (complexe I) et CG17856 (complexe III), il a été observé qu'une légère inhibition de l'expression de ces gènes a été associée à une extension de la durée de vie des mouches, alors qu'une plus forte inhibition provoque plutôt un raccourcissement de la durée de vie (177). En outre, les expériences d'ARNi de plusieurs constituants de l'ETC ont également montré que si la sous-expression est commencée au début de l'âge adulte, les mouches montrent une augmentation de leur durée de vie (177). Cependant, les mouches à longue durée de vie ayant une expression réduite des gènes de l'ETC ne présentent pas systématiquement un assemblage réduit des complexes respiratoires ou des niveaux réduits d'ATP ou une consommation d'oxygène plus faible (177). En outre, les mouches avaient des réponses différentielles aux radicaux libres et à d'autres stress. Alors que les mutants de drosophile à longue durée de vie présentent souvent une résistance accrue au stress oxydatif, cette étude a montré que l'allongement de la durée de vie n'est pas systématiquement corrélé à une résistance accrue à la famine ou au paraquat (177). De même, quatre des lignées d'ARNi ont montré une fertilité réduite malgré le fait que les niveaux globaux d'ATP n'ont pas été réduits (177). Cette constatation suggère que la fertilité réduite de ces lignées peut ne pas résulter d'une réduction des niveaux d'énergie, mais plutôt d'une altération des voies de signalisation cellulaire (177).

Chez les souris, l'inactivation partielle de *mclk1/COQ7*, l'orthologue de *clk-1*, prolonge également la durée de vie moyenne des souris (178). Dans cette étude, il est également démontré que la réduction des niveaux de mCLK1 chez les souris jeunes n'affecte pas les niveaux d'ubiquinone, mais modifie profondément les fonctions de l'ETC et du cycle de Krebs tout en augmentant le stress oxydatif mitochondrial (178). En outre, il est montré que ce dysfonctionnement mitochondrial précoce entraîne une réduction des niveaux de dommages oxydatifs cytosoliques aux protéines (178). De plus, une autre étude a montré que l'ablation du gène *Surf1* (*surfeit locus protein 1*), qui code une protéine de la membrane interne des mitochondries nécessaire à la biogenèse du complexe du cytochrome C oxydase, une enzyme de l'ETC mitochondriale catalysant le transfert d'électrons du cytochrome C réduit à l'oxygène moléculaire, prolonge nettement la durée de vie des souris (7) (175). Ensemble, ces études démontrent que l'inhibition de la respiration mitochondriale permet d'allonger la durée de vie des organismes et que ce mécanisme a été conservé au cours de l'évolution.

## ii. *PGC-1 $\alpha$* , un gène suppresseur de vieillissement.

Chez les mammifères, la petite famille de co-activateurs transcriptionnels PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) coactivator 1), comprenant PGC-1 $\alpha$ , PERC/PGC-1 $\beta$  (PGC-1 related estrogen receptor coactivator) et PRC (PGC-1 related coactivator), est impliquée dans le remodelage de la chromatine, le recrutement d'autres cofacteurs, l'activation de la machinerie transcriptionnelle et la régulation de l'épissage des ARNm (7). Présentant une relative spécificité tissulaire d'expression, ils jouent un rôle central dans la régulation de la biogenèse et la respiration mitochondriale, de l'oxydation des AG et de l'homéostasie du glucose (7). PGC-1 $\alpha$ , en particulier, est souvent cité comme le maître régulateur de la biogenèse mitochondriale. Pour co-activer la transcription d'un gène et ainsi favoriser le métabolisme énergétique et la biogenèse mitochondriale, PGC-1 $\alpha$  doit être recruté par un facteur de transcription ou un récepteur nucléaire (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ...) capable de se lier sur le promoteur du gène concerné (7). Une fois recruté, PGC-1 $\alpha$  induit l'expression des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 (Nuclear Respiratory Factor 1/2) ou du récepteur nucléaire orphelin ERR- $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ ) (7). A leur tour, le couple PGC-1 $\alpha$ -ERR $\alpha$  formé active seul, ou en synergie avec NRF-1 et NRF-2, selon le tissu considéré, la transcription des gènes de l'ETC impliqués dans l'OXPPOS (ex : cytochrome C, cytochrome oxydase 4, ATP synthase...) et du facteur de transcription mitochondrial (TFAM), qui contrôle la transcription et la réplication de l'ADNmt (7). PGC-1 $\alpha$  peut également interagir directement avec NRF-1 pour co-activer la transcription de ses gènes cibles (7). Dans le foie, FOXO1 peut également interagir avec la protéine PGC-1 $\alpha$  au même titre que le facteur de transcription hépatique HNF-4  $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor-4) ou le récepteur des glucocorticoïdes pour co-activer la transcription des gènes de la néoglucogénèse (ex : PEPCK, glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-biphosphatase...) (7). Par ailleurs, dans le muscle, PGC-1 $\alpha$ , en coopération avec le facteur de transcription MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2), peut aussi augmenter l'expression du transporteur de glucose GLUT4 et, en conséquence, le transport de glucose (7). Enfin, PGC-1 $\alpha$  active la transcription des gènes de l'oxydation des AG (ex : *MCAD*, *CTP-1*...), en coopération avec les récepteurs PPAR- $\alpha$  ou ERR $\alpha$  (7).

En tant que régulateurs centraux de l'homéostasie énergétique, les co-activateurs PGC-1 constituent une cible intéressante pour moduler le vieillissement des animaux. Effectivement ces dernières années, un certain nombre d'études ont établi un lien entre les altérations de l'activité du gène *PGC-1 $\alpha$*  et le vieillissement, ainsi que les maladies associées. Notamment, il a été démontré qu'une expression élevée de *PGC-1 $\alpha$*  protège contre la sarcopénie (maladie musculaire) et des maladies neurodégénératives (7). Récemment, une étude a signalé que l'expression de *dPGC-1/CG9809/spargel*, seul homologue de *PGC-1* dans le génome de la drosophile, est significativement diminuée dans l'intestin des mouches âgées, alors que l'expression dirigée de *dPGC-1* dans les CSI et progénitrices (entéroblastes (EB)) de l'intestin est suffisante pour retarder le vieillissement du tissu (67). En outre, il a été observé que le vieillissement entraîne aussi une perte progressive de l'activité de l'ETC mitochondriale dans l'intestin (67). Cependant, la surexpression de *dPGC-1* spécifiquement dans les

CSI/EB avec la lignée pilote *Esg-GAL4* a été suffisante pour augmenter l'activité des complexes I et II des mitochondries dans les cellules intestinales des vieilles mouches (67). Dans cette étude, il a aussi été constaté que la surexpression ciblée de *dPGC-1* dans les CSI/EB a entraîné une prolongation significative de la durée de vie par rapport aux mouches témoins, même si *dPGC-1* est uniquement exprimé à l'âge adulte avec la lignée pilote inducible au RU486, *5961-GAL4-GS* (67). Cependant, un raccourcissement de la durée de vie, voire aucun effet majeur, a été observé lors d'une surexpression ubiquitaire (*Tub-GAL4-GS* et *Da-GAL4*), neuronale (*ELAV-GAL4-GS*) ou musculaire (*MHC-GAL4*) de *dPGC-1* (67). Alors que *PGC-1 $\alpha$*  est nécessaire dans l'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes, il est aussi observé que la surexpression de *dPGC-1* dans les CSI/EB est suffisante pour abaisser les niveaux d'ERO dans toutes les cellules de l'épithélium intestinal des mouches âgées (67).

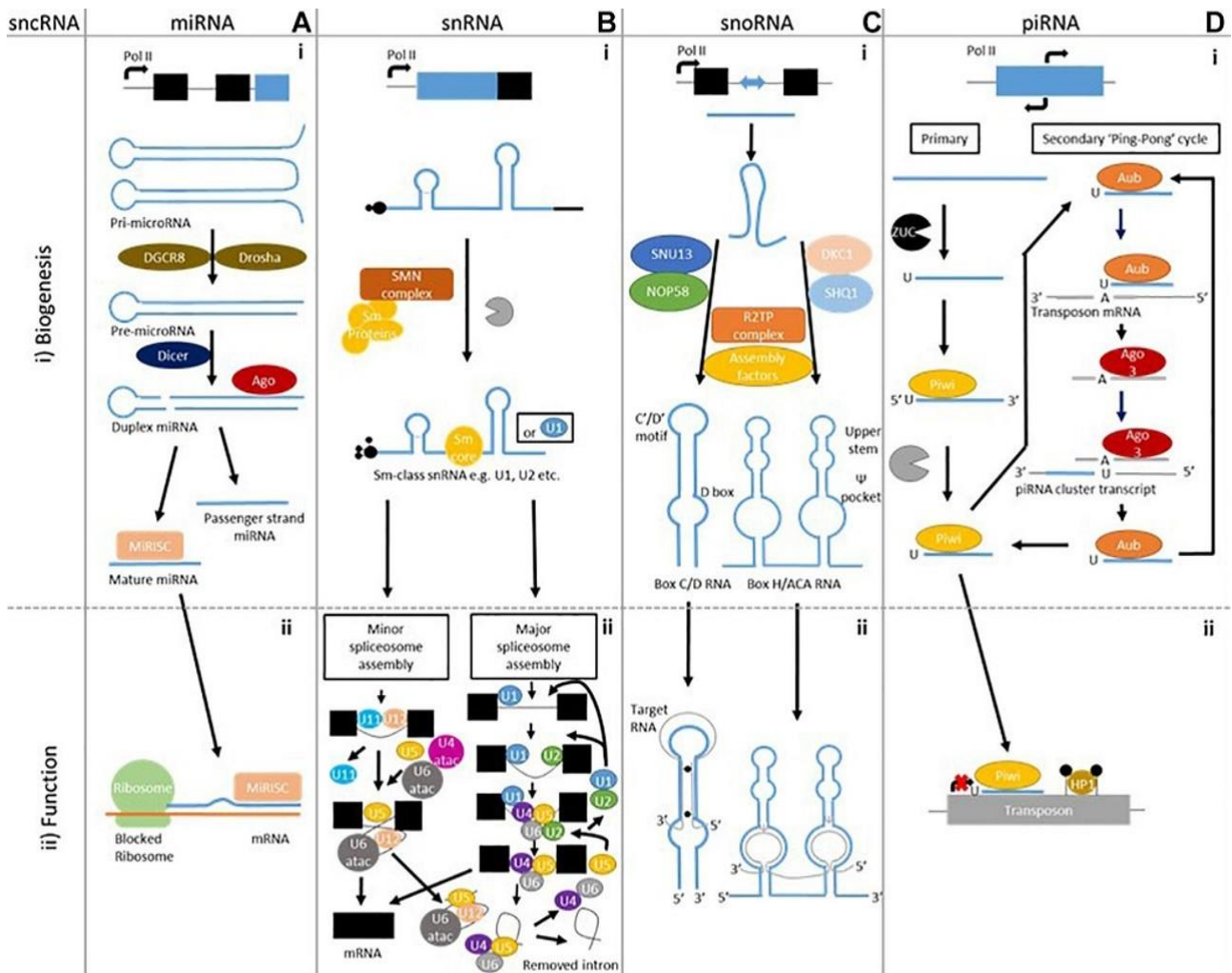
La préservation de l'homéostasie des CSI est devenue un facteur important pour prolonger la longévité en raison du rôle central des CSI dans la préservation des fonctions normales de l'intestin moyen, telles que l'absorption des aliments et la protection contre les micro-organismes et les toxines. Il est bien admis que les manipulations environnementales et génétiques qui préservent l'homéostasie des CSI favorisent un vieillissement sain et prolongent la longévité chez les mouches (180). La prolifération des CSI est considérablement accrue dans l'intestin âgé en raison de l'accumulation d'ERO liée à l'âge, du stress chronique ou de blessures, qui déclenchent des voies de signalisation responsables de l'initiation de la division cellulaire (180). En effet, en plus d'une perte de l'intégrité intestinale qui expose le tissu à des toxines ou à des agents pathogènes, le vieillissement entraîne une augmentation spectaculaire de la prolifération des CSI, générant des populations de cellules filles mal-différenciées et non-fonctionnelles qui sont incapables de remplacer les cellules endommagées de l'intestin et qui expriment à la fois les marqueurs des CSI et des cellules filles différenciées en phase terminale (67) (180). Cependant, les mouches à longue durée de vie qui sur-expriment *dPGC-1* présentent un retard dans l'apparition des changements liés au vieillissement dans l'intestin, ce qui entraîne une amélioration de l'homéostasie tissulaire chez les vieilles mouches (67). En outre, la surexpression de *dPGC-1* entraîne une amélioration de l'intégrité intestinale (67). Ainsi, les données indiquent la possibilité que les altérations de l'activité du *dPGC-1* dans les tissus à fort taux de renouvellement, comme l'intestin, puissent être un déterminant important de la longévité. De plus, les résultats démontrent que *dPGC-1* peut ralentir le vieillissement tant au niveau des modifications cellulaires d'un tissu individuel qu'au niveau de l'organisme en prolongeant la durée de vie.

### **3.2.3. Les ARN non-codants, des nouvelles cibles dans le processus de vieillissement et la longévité.**

Récemment, une classe d'ARN circulants, les ARN non-codants (ARNnc), a été réévaluée car leur importance quantitative et fonctionnelle a longtemps été sous-estimée. Le terme d'ARNnc est employé pour les ARN qui n'ont pas vocation à coder pour des protéines, mais cela ne signifie pas que ces ARN ne contiennent

ni informations ni fonction. Après des années de croyance que 98% du génome humain était "pourri" en raison de sa nature non-codante, nous savons maintenant que les ARNnc jouent un rôle régulateur essentiel dans divers réseaux moléculaires. Sur plus de 98% de l'ADN non-codant (ADNnc) pour les protéines, au moins 90% du génome est activement transcrit. Plus clairement, ces gènes non-codants produisent plutôt des ARN que des protéines comme produit fonctionnel. On en connaît aujourd'hui une grande variété et qu'une partie importante du génome soit transcrite en ARN, alors que, dans le génome humain, seulement moins de 2% de l'information de l'ADN est traduite en protéines (181). Or, nous ne connaissons pas encore la quantité exacte d'ARNnc réellement fonctionnels car ce nombre augmente chaque année.

Les introns, les pseudogènes, les séquences répétées, les télomères et les éléments cis/trans-régulateurs font tous partie de cette classe d'ADNnc et une partie conséquente de celle-ci est transcrite en ARNnc comprenant des molécules d'ARN fonctionnel. Cette classe de transcrits est composée abondamment d'ARN ribosomiaux (ARNr) et d'ARN de transfert (ARNt), et une petite fraction, mais fondamentale, d'autres types d'ARN, tels que les petits ARN nucléolaires (snoARN), les microARN (miARN), les petits ARN interférents (pARNi), les petits ARN nucléaires (snARN), les ARN interagissant avec les protéines PIWI (ARNpi) et les longs ARNnc (lncARN) (Fig. 14). Actuellement, ces ARNnc peuvent être classés par rapport à leur longueur - petits de 18 à 200 nucléotides (nt) et longs > 200 nt - leur fonction avec des ARNnc dits « ménagers » tels que les ARNr et les ARNt ou des ARNnc régulateurs comme les miARN et les lncARN, ou encore par leur localisation subcellulaire avec les snARN dans le noyau, les snoARN dans le nucléole et les ARNpi et pARNi dans le cytoplasme (181). Alors que les ARNr et ARNt sont largement connus et caractérisés, une grande importance a été accordée à l'étude des ARNnc régulateurs au cours de ces dernières années. Les diverses études réalisées dans le but d'élucider la biogenèse et les fonctions de ces ARNnc ont produit de nombreuses preuves du rôle fondamental joué par ces molécules dans diverses voies biologiques. Leur capacité à s'associer à d'autres transcrits et régions suggère qu'ils peuvent être responsables d'une variété de fonctions de régulation. En effet, les ARNnc contrôlent une myriade de processus physiologiques, comme la transcription, l'épissage des ARN, la traduction ou le remodelage de la chromatine (Fig. 14). De plus, les altérations dans l'expression des ARNnc sont impliquées dans le développement et la progression d'un nombre croissant de pathologies comme les cancers, les maladies métaboliques et neurologiques (la maladie d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson) (182). De plus en plus de preuves ont démontré l'importance des ARNnc sur le vieillissement et la longévité de l'organisme, et qu'inversement le vieillissement peut influencer les niveaux d'ARNnc (183) (184) (185). Dans cette partie, nous ferons le point sur la littérature récente dans ce domaine. Nous passerons en revue ce que l'on sait sur le rôle des ARNnc dans le processus de vieillissement et la longévité. Les miARN sont les doyens de ce bestiaire, le premier ayant été identifié en 1993 (38).



**Figure 14 – Biogenèse et un exemple de la fonction de certaines classes d'ARN non-codants existantes.**

**(A) (i)** Les miARN sont des ARN simple-brin d'~ 22 pb formées à partir de précurseurs double-brin (pré-miARN) **(ii)** qui régulent l'expression des gènes par modulation de la traduction des ARNm dont ils sont complémentaires. **(B) (i)** Les snARN sont divisés en deux classes : les snARN de type Sm et les snARN de type LSM (non représenté), **(ii)** qui participent à l'épissage des ARNm au sein du spliceosome. Le mécanisme d'épissage est réalisé soit par le spliceosome majeur, la forme la plus abondante, soit par le spliceosome mineur. **(C) (i)** Les snoARN sont répartis en deux grandes classes formées par des mécanismes différents : les snoARN à boîtes C/D et à boîtes H/ACA, **(ii)** qui permettent respectivement la 2'-O-méthylation et la pseudouridylation des ARN cibles. **(D) (i)** Les ARNpi peuvent être générés selon deux voies parallèles : soit par la voie de biogenèse primaire seulement, soit par la voie de biogenèse primaire et secondaire. **(ii)** Les ARNpi matures bloquent l'activité d'éléments mobiles présents dans l'ADN (transposons et rétroéléments) par méthylation. **Ψ** : Pseudouridine ; **AGO** : Argonaute ; **ANG** : Angiogenin ; **Aub** : Aubergine ; **DGCR8** : DiGeorge syndrome critical region 8 ; **RISC** : RNA-induced silencing complex ; **Pol II** : ARN polymérase de type II ; **pri-miARN** : primary miARN ; **RNase P** : Ribonucléase P ; **tRF** : tRNA derived fragment ; **U** : Uridine ; **Zuc** : Zucchini. Source : Prise de (182).

### a. Les microARN, des ARN non-codants pour réguler l'expression des gènes.

Le rôle des miARN dans le contrôle des processus de vieillissement a été découvert récemment avec la découverte des miARN qui régulent la durée de vie du nématode *C. elegans* par le biais de la signalisation



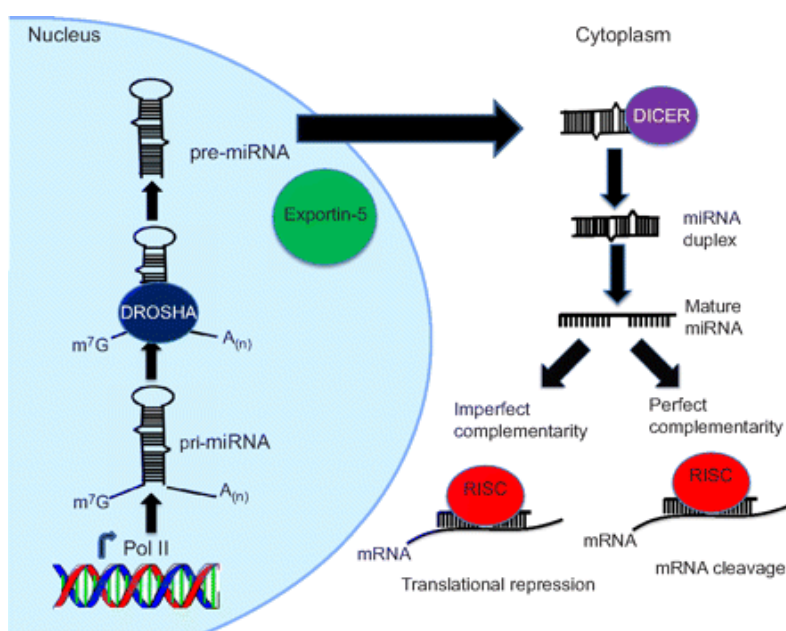
de l'insuline et de l'IGF-I, et des facteurs de contrôle des dommages à l'ADN. Plusieurs études utilisant des organismes modèles ont révélé que les niveaux de nombreux miARN sont dérégulés au cours du vieillissement : ils sont soit surexprimés, soit sous-exprimés (186) (187). Ces modifications se répercutent sur leurs fonctions, et des changements de leur profil d'expression ont été décrits dans plusieurs pathologies, notamment les cancers. Ces différences de niveaux peuvent aussi avoir des conséquences sur la longévité (186) (187). Depuis qu'une étude a rapporté que le miARN *lin-4* régule la durée de vie des *C. elegans*, les miARN sont considérés comme des facteurs importants du vieillissement (188).

### **i. Définition.**

Les miARN sont une catégorie de petits ARNnc monocaténaire de 18 à 24 nt de long, hautement conservés et présents dans toutes les cellules eucaryotes (189). Ils ont été les premiers petits ARN endogènes à avoir été identifiés. Le premier miARN, *lin-4*, a été trouvé en 1981 chez le *C. elegans* avec une caractérisation moléculaire en 1993 (190). A ce jour, dans la dernière version de miRBase (v.22) (<http://www.mirbase.org/>), la base de données officielle des miARN, plus de 38 589 miARN ont été identifiés et décrits dans des organismes aussi divers que l'homme, la souris, le ver, la drosophile et aussi dans la petite plante *Arabidopsis thaliana*, et ils seraient exprimés dans tous les types de cellules. Ils constituent ainsi la classe la plus abondante de petits ARN chez les animaux. De plus, un nombre important de ces miARN sont conservés au cours de l'évolution, plus d'un tiers des miARN de *C. elegans* ayant des homologues clairs parmi les miARN humains (191). La fonction primaire des miARN est de réguler l'expression des gènes après la transcription via leur liaison avec les ARNm. Cette régulation se fait par deux mécanismes qui dépendent du degré de complémentarité entre leur séquence et celle de leurs ARNm cibles. Si la complémentarité de séquence est parfaite, la liaison du miARN entraînera la dégradation de l'ARNm. Au contraire, si la complémentarité de séquence est imparfaite, il n'y aura pas de dégradation de l'ARNm mais une inhibition de sa traduction en protéine (189). Un transcrit donné peut être ciblé par plusieurs miARN et, inversement, chaque miARN peut avoir jusqu'à plusieurs centaines de gènes cibles (189). Etant donné leur rôle de petites molécules régulatrices, les miARN peuvent influencer un large éventail de fonctions biologiques complexes et fondamentales, telles que le développement, la signalisation cellulaire, la différenciation, la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme (189) (192), et que leur expression aberrante s'est avérée être à l'origine d'une variété de pathologies, telles que les cancers/tumeurs, le diabète, les infections virales, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et encore d'autres (193). En outre, les miARN sont récemment apparus comme d'importants régulateurs de la sénescence et du vieillissement cellulaire. À ce jour, il a été démontré que de nombreux miARN sont régulés positivement ou négativement de manière significative avec le vieillissement ; beaucoup de ces miARN ont été identifiés comme modulateurs du processus de vieillissement au niveau des tissus ou de l'organisme, ou de la sénescence cellulaire en passant par du nématode aux mammifères (187) (194) (195).

## ii. Production de microARN canoniques.

Canoniquement, la majorité des miARN de mammifères sont codés dans des introns situés dans des gènes non-codants ou codants des protéines, tandis que les miARN restants sont produits à partir des régions exoniques dans des gènes non-codants (189) (196) (Fig. 15). De nombreux gènes de miARN ont tendance à se trouver à proximité d'autres miARN et sont transcrits sous forme de transcrits polycistroniques (197). Souvent, les miARN sont d'abord transcrits sous la forme de longs transcrits primaires (pri-miARN) par l'ARN polymérase de type II. À la suite de sa transcription, s'ensuit la première étape de maturation avec le clivage des pri-miARN dans le noyau par le microprocesseur constitué d'une ribonucléase de type III, DROSHA, et de son cofacteur DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), aussi appelé Pasha (Partner of DROSHA) chez la drosophile et PASH-1 chez le *C. elegans*, pour former des précurseurs (pré-miARN) qui ont une structure en épingle à cheveux (197). Ensuite, l'exportine 5 (XPO-5) (XPO-1 chez le *C. elegans*), associée à une protéine liant le GTP, Ran-GTP, transloque les pré-miARN du noyau vers le cytosol. Dans le cytoplasme, les pré-miARN sont de nouveau clivés par un complexe enzymatique comprenant DICER, une ribonucléase de type III (DICER-1 chez la drosophile) et de ses partenaires protéiques PACT (protein activator of PKR) et TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) (*Loquacious* chez la drosophile) générant des miARN matures double-brin avec un brin guide et un brin passager (189) (196) (197). Le duplex miARN ainsi formé est alors pris en charge par une protéine Argonaute (AGO) aidée de la protéine chaperonne HSP-90 (Heat Shock Protein 90). Le brin passager est dégradé, le brin guide restant, qui est complémentaire à la cible, ancré dans la protéine AGO pour former le miRISC (RNA-induced silencing complex). Celui-ci pourra s'associer à ces ARNm cibles afin de réprimer leur traduction (196) (Fig. 15).



**Figure 15 – Biogenèse et fonctions post-transcriptionnelles des microARN.**

Les miARN sont codés par les régions inter-géniques ou introniques, souvent sous forme de long transcrit primaire d'environ 70 nt (pri-miARN) et ont adopté une structure en épingle à cheveux. Ces pri-miARN sont clivés par une endonucléase

nucléaire DROSHA en précurseurs (pre-miARN). Les pré-miARN sont ensuite transformés dans le cytoplasme par l'endonucléase DICER en un intermédiaire linéaire double-brin (duplex miARN), qui à leur tour, recrutent un complexe multiprotéique comportant une protéine de la famille des Argonautes (AGO) et d'une hélicase, communément appelé complexe miRISC. Le brin complémentaire du miARN est éliminé et le brin de miARN mature d'environ 22 nt guide le complexe protéique vers des ARNm cibles avec lesquels ils présentent un certain degré d'homologie. Le complexe miRISC déposé est capable d'extinction de l'expression du gène en inhibant la traduction de l'ARNm ciblé et/ou en déstabilisant l'ARNm ciblé. **m<sup>7</sup>G** : 7-méthylguanosine ; **Pol II** : ARN Polymérase II ; **RISC** : RNA-induced silencing complex. Source : Prise de (194).

### iii. Le rôle des microARN dans la longévité.

On sait que de nombreux miARN affectent la durée de vie des organismes et qu'un certain nombre d'entre eux sont exprimés de manière différentielle au cours du vieillissement (186) (187). L'une des premières découvertes révolutionnaires qui a démontré le rôle des ARNnc, en particulier des miARN, dans la longévité et le vieillissement des organismes a été rapportée par le groupe de Franck SLACK. Ils ont démontré que le miARN *lin-4*, le premier miARN à être fonctionnellement caractérisé pour son rôle dans la longévité, et sa cible *lin-14*, un facteur de transcription, contrôlent la durée de vie des *C. elegans* adultes. Plus précisément, les animaux porteurs d'une mutation de perte de fonction de *lin-4* ou d'une mutation de gain de fonction de *lin-14* ont montré un raccourcissement de la durée de vie et une accélération du vieillissement tissulaire. Inversement, la surexpression de *lin-4* ou la régulation négative de l'activité de *lin-14* avec l'utilisation d'un ARNi a entraîné une durée de vie plus longue (188). L'étude a aussi montré que les mutants *lin-4* présentent un taux de vieillissement accru avec notamment des niveaux d'ERO élevés, une plus grande sensibilité au choc thermique et une activité locomotrice réduite par rapport aux animaux de type sauvage, tandis que les mutants *lin-14* présentent des phénotypes opposés (188). De plus, cette prolongation de la durée de vie conférée par une réduction de *lin-14* et une surexpression de *lin-4* était dépendante à la fois du facteur de transcription de la voie de l'IIS, DAF-16/FOXO, et du facteur de transcription de choc thermique, HSF-1, suggérant que *lin-4* et *lin-14* affectent la durée de vie en régulant négativement la voie de l'IIS (188). Ces premiers travaux ont dévoilé une nouvelle contribution importante des miARN dans la régulation de la progression du vieillissement et de la durée de vie chez le *C. elegans*, peut-être via des voies de signalisation conservées comme celle de l'IIS.

Depuis cette publication fondamentale, plusieurs autres miARN potentiellement impliqués dans le processus de vieillissement ont été décrits chez diverses espèces, du *C. elegans* aux mammifères. Par exemple, *mir-71*, *mir-80*, *mir-83*, *mir-238*, *mir-239* et *mir-246* ont également montré qu'ils influençaient la durée de vie des nématodes. Les mutants de *C. elegans* qui contiennent des délétions de *mir-71*, *mir-238* ou *mir-246* ont une durée de vie significativement réduite que celle des animaux témoins, tandis que la surexpression de *mir-71* ou *mir-246* augmente la durée de vie, ce qui indique que ces miARN fonctionnent pour favoriser la longévité (187). En revanche, les mutations de *mir-80*, *mir-83* ou *mir-239* prolongent la durée de vie, alors que la surex-

pression de ces miARN produit l'effet inverse, démontrant que *mir-80*, *mir-83* ou *mir-239* ont des effets antagoniste sur la longévité (187) (198) (199). De plus, on s'attend à ce que ces miARN associés à l'âge modulent des voies génétiques impliquées dans la détermination de la durée de vie par le contrôle de leurs gènes cibles. Comme *lin-4*, les miARN *mir-71*, *mir-80*, *mir-83* et *mir-239* ciblent des composants des voies de régulation conservées pour moduler la durée de vie, en l'occurrence la voie IIS bien connue pour son rôle central dans la longévité (187) (198). D'après les études sur la durée de vie, il est probable que *mir-71* et *mir-239* fonctionnent tous deux dans la voie IIS, puisque la longue durée de vie induite par la perte de *mir-239* dépend de DAF-16/FOXO, et que la perte de *mir-71* réduit de manière significative la durée de vie due à la perte de *DAF-2*. De plus, *mir-71* cible les composants AKT-1, AGE-1, DAF-16/FOXO et PDK-1 de la voie IIS, car la perte de *mir-71* a entraîné une augmentation de l'expression génétique de ces protéines chez les animaux âgés. Ainsi, *mir-71* favorise la longévité en réduisant l'activité des gènes impliqués dans la voie IIS (187). Inversement, chez les animaux âgés, la perte de *mir-239* a entraîné une réduction significative des niveaux d'ARNm d'*AGE-1* et *PDK-1*, ce qui suggère que *mir-239* pourrait agir en amont de ces gènes par des mécanismes qui restent à déterminer (187). La délétion de *mir-80* favorise le vieillissement en bonne santé des *C. elegans* et semblerait agir via un mécanisme de restriction alimentaire. Plus en détails, l'expression de *mir-80* est généralement élevée en présence de nourriture mais faible lorsque la nourriture manque. De plus, l'extension de la durée de vie conférée par un faible niveau de *mir-80* dépend fortement des facteurs de transcription FOXO/DAF-16, HSF-1 et CBP-1, un homologue des cofacteurs transcriptionnels CBP (CREB-binding protein) de mammifères impliqués dans la co-activation transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription (198). La mutation de perte de fonction de *mir-83* augmente également la durée de vie par l'intermédiaire de DAF-16/FOXO (199).

Chez les mouches, il a été démontré que *mir-34* et *mir-277* affectent la durée de vie. Alors que la perte de *mir-34* provoque une accélération du processus de vieillissement de l'organisme avec une détérioration cérébrale et un déclin de la durée de vie, sa surexpression favorise la longévité et maintient l'homéostasie neuronale. Ces effets observés de *mir-34* liés à l'âge nécessitent la répression translationnelle de l'Eip74EF, un facteur de transcription essentiel impliqué dans les voies de signalisation conservées des hormones stéroïdiennes (200). Cependant une autre étude chez le *C. elegans* a rapporté qu'une mutation de perte de fonction de *mir-34* retarde nettement le déclin physiologique lié à l'âge, prolonge la durée de vie et augmente la résistance au stress oxydatif. De plus, une augmentation du processus autophagique est nécessaire pour une élongation de la longévité induite par la perte de *mir-34*. En effet, *mir-34* réprime l'autophagie en inhibant directement l'expression des protéines Atg9 associées à l'autophagie dans les cellules de mammifères (201). De même, une expression réduite de *mir-277* pendant l'âge adulte raccourcit la durée de vie des *C. elegans*. Il est supposé que cette réduction de la durée de vie est due à l'activation de la kinase TOR (cible de la rapamycine), un régulateur central de la croissance cellulaire, via la modulation du catabolisme des AA à chaînes ramifiées. En effet, les AA à chaînes ramifiées, en particulier la leucine, sont un des principaux activateurs physiologiques de la signalisation de TOR (202). Des modèles de souris de longévité réduite ont également indiqué que les miARN ont un rôle important dans le vieillissement. Par exemple, un modèle murin atteint du syndrome

de Hutchinson-Gilford ou progéria, se manifestant par un vieillissement accéléré dû à une mauvaise maturation de la lamine A dans l'enveloppe nucléaire, a identifié des niveaux très élevés de *mir-1* dans le foie, ainsi que dans les reins et les muscles par rapport à ceux des animaux de type sauvage. De plus, l'IGF-I est une cible de *mir-1*, ce qui indique que ce miARN fonctionne à travers la voie IIS en supprimant les niveaux d'IGF-I chez les souris présentant un vieillissement prématuré, et peut-être aussi pendant le vieillissement habituel (194). Il a aussi été démontré que des miARN sont régulés dans l'hippocampe de souris naines de la lignée *Âmes* à longue durée de vie avec notamment une régulation positive de *mir-470*, *mir-669b* et *mir-681* au cours de la vie adulte. Une étude a montré que ces miARN suppriment l'expression du gène codant l'IGF-1R et l'AKT, ainsi que la phosphorylation de l'AKT, entraînant ainsi une diminution de la phosphorylation de FOXO3 et soulignant à nouveau de l'importance de la voie de l'IIS dans le vieillissement (194). Il devient maintenant évident que les miARN ont un rôle essentiel dans la détermination de la durée de vie en modulant les processus de réponse aux dommages de l'ADN, l'homéostasie des protéines, le métabolisme des mitochondries, ainsi que plusieurs facteurs de régulation du vieillissement, notamment ceux de la voie de signalisation de l'IIS.

En plus des études sur les mutants des miARN, des analyses transcriptomiques (puce à ADN) sur le *C. elegans* ont révélé que de nombreux miARN des nématodes présentent des changements distincts dans leur expression au cours de la vie adulte (186). Par exemple, les niveaux de *mir-71* et *mir-246* augmentent significativement avec l'âge, ce qui implique que l'augmentation des niveaux de miARN en fonction de l'âge joue un rôle protecteur contre une courte durée de vie dans ce cas (187). Toutefois, le niveau élevé de *mir-34* au cours du vieillissement a plutôt un effet néfaste sur la durée de vie des mouches (200). Bien que certains miARN comme *mir-71*, *mir-34* et *mir-246*, soient régulés positivement pendant le vieillissement, la grande majorité des miARN de *C. elegans* qui sont exprimés différemment pendant le vieillissement sont en fait régulés négativement (186) (187). Ces observations indiquent ainsi que le vieillissement affecte les niveaux de miARN de différentes manières. De plus, comme de nombreux miARN régulés en fonction l'âge sont conservés, il est suggéré que leurs homologues humains pourraient être régulés de la même manière pour moduler le déclin associé à l'âge.

#### **b. D'autres petits ARN non-codants ayant des fonctions potentielles dans le vieillissement.**

Les miARN peuvent ne représenter qu'une petite partie des ARN régulateurs impliqués dans le vieillissement. De récentes expériences de séquençage ont conduit à la découverte d'une variété étonnamment grande de petits ARNnc. En plus des miARN matures, d'autres types de petits ARNnc sont également susceptibles d'influencer le vieillissement. Plus précisément, de nombreuses classes de petits ARNnc ont présenté des changements d'expression significatifs au cours du vieillissement chez le *C. elegans*. Parmi eux, nous pouvons identifier des snoARN, des lncARN, des ARNpi, des pARNi endogènes et de courts fragments dérivés d'ARNt

(tRF) qui s'expriment différemment au cours du vieillissement (183) (185). Nous abordons ici le rôle potentiel des ARNpi et des lncARN dans la régulation de la durée de vie et du vieillissement.

### **i. Les ARN interagissant avec les protéines PIWI.**

Les ARNpi sont de petits ARNnc de 24 à 31 nt de long qui sont associés aux protéines PIWI et qui sont exprimés spécifiquement dans les cellules des lignées germinales de tous les animaux. Récemment, il a été signalé que les ARNpi sont aussi largement exprimés dans les cellules somatiques. Les ARNpi sont divisés en deux classes en fonction de la voie de biogenèse qui leur est associée : la voie de transformation dans les cellules somatiques et le cycle « ping-pong » dans les cellules germinales (Fig. 14). Ils possèdent un groupement 2'-O-méthyl en 3' permettant leur reconnaissance par les protéines PIWI, ainsi qu'une base uridine à leur extrémité 5' (203). Leur rôle est de protéger les cellules germinales contre les éléments transposables présents dans l'ADN en les inactivant par différents mécanismes au cours de la gamétogenèse (203). Ces ARN sont complémentaires aux séquences de ces transposons et pourraient agir par un mécanisme analogue aux miARN. En effet, ils ont la capacité d'interagir avec des protéines AGO spécialisées, appelées PIWI, qui ont des caractéristiques communes avec le complexe miRISC (204). Un des mécanismes d'action connu des ARNpi dans l'inactivation des éléments transposables serait par l'intermédiaire de l'activité de l'endonucléase PIWI, qui leur permet de cliver la cible et donc d'engager la dégradation de l'ARNm des rétrotransposons. Le génome humain code pour quatre protéines de type PIWI, à savoir HIWI (PIWIL1), HILI (PIWIL2), HIWI2 (PIWIL4) et HIWI3 (PIWIL3) ; alors que chez le *C. elegans* il en existe deux, PRG-1 et PRG-2, et trois chez la drosophile, PIWI, Aubergine (Aub) et AGO3 (203). La fonction des ARNpi est conservée au cours de l'évolution. Ils sont cependant utilisés différemment selon les espèces afin de réprimer les transposons (203) (204). En plus d'induire la dégradation des éléments transposables, de récentes études ont indiqué que les ARNpi sont aussi impliqués dans la régulation épigénétique (205).

Récemment, certaines recherches ont démontré que les ARNpi pourraient avoir un rôle clé dans le processus de vieillissement des organismes. Une première étude a montré que la mutation de la protéine PIWI des *C. elegans*, PRG-1, entraîne une diminution de la fertilité, mais que ce défaut a été corrigé après l'augmentation de l'activité du facteur de transcription DAF-16/FOXO de la voie IIS impliquée dans la longévité (185). Dans un second temps, il a été montré qu'au cours du vieillissement les niveaux des ARNpi diminuent significativement chez le *C. elegans* (183). Chez la drosophile, la perte de PIWI entraîne l'apoptose des CSI en division et de leurs descendants. Cependant, leur expression est nécessaire et suffisante pour améliorer l'homéostasie épithéliale en réduisant la mauvaise différenciation et l'apoptose des CSI associées à l'âge, mais aussi pour atténuer l'expression des rétrotransposons et prévenir les dommages à l'ADN. En effet, l'expression et la transposition des éléments transposables sont augmentées avec l'âge chez la drosophile (185). Ces premiers résultats concordent avec la possibilité que les protéines PIWI et les ARNpi joueraient un rôle anti-vieillessement au

moins dans ces deux modèles d'invertébrés. Cependant, la relation directe entre les ARNpi et la durée de vie reste inconnue et devrait être testée expérimentalement dans le cadre de travaux futurs.

## ii. Les longs ARN non-codants.

Les lncARN sont des transcrits de plus de 200 nt dont certains pouvant atteindre plusieurs centaines de kilobases, qui ne codent pas pour les protéines mais qui ont la capacité de réguler l'expression des gènes (206). Les lncARN partagent dans leur grande majorité des caractéristiques similaires aux gènes codant des protéines (ARNm). En effet, les lncARN subissent des modifications post-transcriptionnelles afin d'augmenter leur stabilité ; certains présentent une coiffe à leur extrémité 5' (m<sup>7</sup>G) les rendant moins vulnérables aux endonucléases et/ou favorisant leur exportation du noyau au cytoplasme, et ils sont pour la plupart polyadénylés à leur extrémité 3' (206). Toutefois, et comparativement aux ARNm, les lncARN sont généralement plus enrichis dans le noyau et montrent une plus faible conservation de séquence, bien que certains d'entre eux soient fortement conservés (206). De plus, les gènes de lncARN s'expriment plus faiblement que les gènes codants et leur expression est remarquablement spécifique à certains tissus. La plupart des lncARN sont dérivés de régions intergéniques, appelés lincARN, ou proviennent de brins opposés de gènes codant pour les protéines, dénommés lncARN anti-sens (206) (207). Au cours des deux dernières décennies, un grand nombre de lncARN exprimés dans une variété de tissus et de lignées cellulaires ont été identifiés grâce à la mise au point de diverses approches génétiques et la quantité de grands transcrits non-codants annotés dans le génome est en constante expansion. Actuellement, la dernière version de LNCipedia, un catalogue regroupant les séquences de lncARN connues (<http://www.lncipedia.org>), a recensé plus de 127 802 transcrits détectés chez toutes espèces confondues.

De nombreuses études sur les lncARN ont permis de mettre en lumière leurs divers rôles dans les différents processus biologiques : ils interviennent notamment dans la régulation de l'expression des gènes à travers des mécanismes variés sur l'épigénétique et la transcription jusqu'aux modifications post-transcriptionnelles via l'interaction avec de nombreuses molécules (ADN, ARN, protéines, chromatine, petits ARNnc) (206) (208). Ils se retrouvent ainsi impliqués dans la totalité des mécanismes de régulation, ce qui fait d'eux des régulateurs génomiques puissants. En effet, les lncARN peuvent affecter de nombreux réseaux de régulation physiologiques et pathologiques, comme la régulation des gènes codant les protéines, la maturation des ARNm, l'architecture du génome et l'activité des protéines, ainsi que dans le contrôle de la pathogenèse (206) (208). Les lncARN agissent essentiellement dans la modulation de l'expression génétique par divers mécanismes. Ils peuvent agir de manière épigénétique en recrutant des facteurs de transcription ou des acteurs de la modification d'histones ou de la réorganisation de la chromatine pour activer ou inactiver différents loci (206) (208). Les lncARN sont aussi largement impliqués dans les processus post-transcriptionnels en s'appariant aux ARNm pour moduler leur traduction et/ou leur stabilité et en interférant avec les protéines de liaison de l'ARN

pour influencer l'épissage et la traduction (206) (208). D'autres lncARN peuvent également jouer le rôle d' « *enhancer* » en induisant la transcription en *cis* ou en *trans* (206) (208). D'autres lncARN peuvent aussi agir comme des échafaudages moléculaires en s'associant à différentes protéines et en formant des complexes ribonucléoprotéines (RNP) pour cibler les gènes afin d'activer ou de réprimer leur expression (206) (208). Certains lncARN servent aussi d'éponge à miARN empêchant ainsi leur effet de répresseur traductionnel et conduisant à l'augmentation du taux de la protéine cible. En plus de modifier la structure de la chromatine et d'influencer l'expression des gènes, il a été démontré que certains lncARN contrôlent le renouvellement des protéines en facilitant l'ubiquitination ou dans la régulation de la stabilité ou de l'activité des protéines (207) (208). Plus généralement, les lncARN sont impliqués dans divers processus biologiques, incluant par exemple la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, le métabolisme, l'apoptose, la différenciation et la réponse cellulaire au stress (209). De plus, des preuves de plus en plus nombreuses convergent pour indiquer que les lncARN peuvent être associés au développement de pathologies humaines associées à l'âge. Étant donné leurs contributions aux processus physiologiques, une altération du niveau d'expression des lncARN pourrait mener au développement de pathologies comme le cancer, les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires, etc... (209) Les quelques exemples qui ont été étudiés jusqu'à présent démontrent clairement leurs rôles dans plusieurs processus physiologiques fondamentaux. De même, la mise en évidence de leur implication dans de nombreuses pathologies ne cesse d'augmenter. Parmi les exemples de lncARN associés au cancer, nous avons *HOTAIR* (*Hox antisense intergenic RNA*) et *MALAT1* (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), les lncARN les plus étudiés dans ce domaine. Plusieurs publications ont rapporté que les expressions de *HOTAIR* et *MALAT1* sont accrues dans les tumeurs et que cette surexpression a entraîné une augmentation des métastases (210) (211).

Plusieurs études ont également montré qu'il est de plus en plus évident que les lncARN peuvent influencer le processus de vieillissement (207) (209). Tout comme les miARN, les lncARN sont également sujets à des modifications d'expression avec l'âge (207) (209). Ces changements sont corrélés avec des pathologies liées au vieillissement, ou au contraire, semblent améliorer la longévité (207) (209). Une étude en particulier a montré que des lncARN connus et annotés participent à la modulation des événements moléculaires majeurs qui sous-tendent le processus de vieillissement, soit le maintien de la longueur des télomères (ex : *TERC* et *TERRA*), l'expression épigénétique des gènes (ex : *Xist*, *TARID*, etc...), la protéostasie (ex : *HOTAIR*, *HULC*, etc...), la modulation de la fonction des cellules souches (ex : *ES1/ES2/ES3*, etc...), la croissance, la différenciation et la sénescence cellulaire (ex : *MALAT1*, *HEIH*, etc...), et la communication intercellulaire (ex : *Lethe*, *17A*, etc...) (207). Les exemples abordés dans cette étude soulignent la reconnaissance croissante du fait que les lncARN affectent de manière critique à la fois le déclin physiologique qui se produit avec le vieillissement et les pathologies associées à l'avancée en âge. Quelques études ont aussi démontré que les lncARN peuvent réguler la durée de vie des organismes. Par exemple, le lncARN *tts-1* (*transcribed telomeric sequence 1*) chez le *C. elegans* est nécessaire pour la longévité en réduisant les niveaux de ribosomes. En effet, la perte de *tts-1* chez les mutants



DAF-2 (récepteur de l'insuline/IGF chez le *C. elegans*) augmente les niveaux de ribosomes et réduit considérablement leur durée de vie (212). Par conséquent, ces données ont montré qu'il est probable que d'autres lncARN puissent également moduler la durée de vie en affectant des voies de signalisation de la longévité connues ou nouvelles.

### **c. Les snoARN, un nouveau marqueur non-établi de la longévité et du processus de vieillissement.**

Comme mentionnées précédemment, une série d'études indépendantes utilisant divers organismes, le *C. elegans* en particulier, ont démontré que les petits ARNnc, tels que les miARN, influencent le vieillissement et la longévité. La modification post-transcriptionnelle de l'ARN et le contrôle de la stabilité et de la traduction de l'ARNm sont des éléments importants de la régulation de l'expression des gènes. Les petits ARNnc jouent un rôle considérable dans ces processus : ils contrôlent le dynamisme des chromosomes, guident la modification des nucléotides d'ARNr et de snARN, influencent l'épissage alternatif des ARNm précurseurs (pré-ARNm) complémentaires, et contrôlent la traduction et la stabilité des ARNm (182). En effet, les petits ARNnc sont des régulateurs clés de l'expression des gènes et du remodelage de la chromatine, en agissant par l'intermédiaire de liaisons de type Watson-Crick avec leurs cibles (182). De plus, des études ont montré que les ARNnc sont dérégulés dans un large éventail de processus physiologiques et pathologiques, y compris les cancers, les maladies cardiovasculaires, les troubles neurodégénératifs, le vieillissement, etc.... (182)

Cependant, d'autres types de petits ARNnc se sont révélés prometteurs dans leur contribution à la pathogenèse : les petits ARN nucléolaire (snoARN). La principale fonction canonique des snoARN est la modification post-transcriptionnelle des ARNr, à savoir la 2'-O-méthylation et la pseudouridylation. Certains d'entre eux peuvent également participer à la régulation de l'épissage alternatif et à la modification post-transcriptionnelle des ARNm. Cependant étant donné leurs implications dans un large éventail de processus biologiques, il a déjà été prouvé qu'une dérégulation des snoARN pourrait affecter de nombreux processus cellulaires vitaux et ainsi mener à l'émergence de diverses pathologies, comme le cancer ou les maladies neurodégénératives (182) (213) (214). Parmi les snoARN associés au cancer par exemple, nous avons le snoARN à boîtes H/ACA, *SNORA42*. Une publication a rapporté une surexpression de *SNORA42* dans le cancer bronchique non à petites cellules, où il participerait à la croissance des cellules cancéreuses (215). Cependant, le blocage de l'expression de *SNORA42* à l'aide d'un pARNi a entraîné une réduction significative de la croissance des cellules cancéreuses, a inhibé la formation de métastases, et a ainsi compromis la tumorigénicité dans les modèles d'animaux. De plus, le niveau d'expression de *SNORA42* dans un échantillon de tissu tumoral du poumon s'est avéré inversement corrélé à la survie des patients atteints du cancer bronchique non à petites cellules (215). Par conséquent, il est probable que les snoARN modulent également la durée de vie en affectant potentiellement des voies de signalisation de la longévité. Des fonctions oncogéniques ou suppresseurs de tumeur ont été suggérées pour plusieurs autres snoARN dans, entre autres, le cancer de la prostate (*SNORDU50*), du sein (les snoARN à boîtes

*C/D U50, RNU43, RNU44* et *SNORD44*) et la tumeur cérébrale (le snoARN à boîtes H/ACA *h5sn2*) (214). Ainsi, ces données semblent révéler que les membres de snoARN sont impliqués dans la cancérogenèse, où ils peuvent se comporter comme oncogènes ou comme gènes suppresseurs de tumeurs (214). La participation des snoARN au développement de pathologies ne se limite cependant pas aux cancers. Ainsi, la dérégulation de l'expression de snoARN est aussi associée au développement de maladies neurodégénératives (182). Dans des modèles murins atteints de la maladie d'Alzheimer, deux snoARN de type C/D, *e307* et *e470*, ont été identifiés et dont l'expression a été dérégulée avant la formation de la plaque  $\beta$ -amyloïde. Ainsi, la présence de ces snoARN pourrait être utilisés à l'avenir comme biomarqueurs de diagnostic précoce dans la maladie d'Alzheimer (216). Dans cette synthèse, nous dévoilerons que les snoARN peuvent représenter une nouvelle cible potentiellement intéressante par rapport à leur éventuelle implication dans le processus de vieillissement et la longévité.

### **i. Définition.**

Les snoARN sont un vaste groupe de petits ARNnc d'une longueur variant de 60 à 300 nt qui s'accumulent dans le nucléole (217). Tandis que les cellules eucaryotes contiennent environ une dizaine de snARN, plusieurs milliers de snoARN hautement conservés tout au long de l'évolution ont été signalés dans une grande variété d'organismes, allant des archées aux eucaryotes supérieurs (217) (218). Chez les archées, ils sont connus sous le nom de petits ARN (sARN) (219). Leur localisation nucléolaire offre un lien direct avec leur fonction classique : la majorité des snoARN fonctionnent comme des ARN guides pour la modification post-transcriptionnelle des ARNr. Ces modifications se regroupent souvent dans des régions fonctionnellement importantes du ribosome et correspondent principalement à des méthylations de nucléotides au niveau des riboses ou encore à l'isomérisation des uridines (pseudouridylation). Chaque transcrit d'ARNr naissant est modifié pour inclure des sucres de ribose 2'-O-méthylés et/ou des pseudouridines ( $\Psi$ ) à des sites spécifiques (environ 100 de chaque modification chez les mammifères et environ 50 de chaque modification chez la levure) (220). Les snoARN modifient ainsi des régions fonctionnellement importantes dans l'ARNr, comme le centre peptidyl-transférase ou le centre de décodage de l'ARNm. Ils sont donc importants pour la production de ribosomes efficaces et précis. En plus de diriger la modification des ARNr, les snoARN guides à boîtes C/D et H/ACA peuvent également cibler des snARN du spliceosome et d'autres ARN cellulaires, y compris les ARNt et les ARNm (218) (219) (221). D'autre part, les snoARN ne fonctionnent pas uniquement dans la modification des ARNr, un sous-ensemble de snoARN sont aussi nécessaires dans les étapes de clivage nucléolytique des pré-curseurs ribosomiques (pré-ARNr) (218) (219) (221). Des études montrent également que certains snoARN régulent l'épissage alternatif des pré-ARNm (218) (219) (221).

Les snoARN, de la levure à l'Homme, sont répartis en deux grandes classes qui possèdent des éléments de séquence distincts, conservés au cours de l'évolution et sont impliquées dans deux types différents de modifications post-transcriptionnelles : les snoARN à boîtes C/D (SNORD) qui définissent les sites cibles pour

la 2'-O-méthylation et les snoARN à boîtes H/ACA (SNORA) guidant les réactions de pseudouridylation (218). Une autre sous-famille distincte de snoARN, connue sous le nom de petits ARN spécifiques des corps de Cajal (scaARN), qui ne sont pas à proprement parler des snoARN puisqu'ils ne s'accumulent pas spécifiquement dans le nucléole. On distingue des scaARN à boîtes C/D et H/ACA mais aussi quelques membres de cette famille contiennent à la fois des boîtes C/D et des boîtes H/ACA et peuvent ainsi guider l'une ou l'autre, ou les deux types de modifications correspondantes (218) (222). C'est le cas du snoARN U85 qui dirige à la fois la 2'-O-méthylation et la pseudouridylation du snARN spliceosomal U5 (223). Une analyse des séquences a démontré que les scaARN abritent des motifs nucléotidiques supplémentaires nécessaires à une localisation correcte dans les corps de Cajal. En effet, les boucles terminales des épingles à cheveux des scaARN à boîtes H/ACA contiennent en plus un court motif hautement conservé, la boîte CAB (UGAG) (Fig. 17B) (218) (222). En revanche, les scaARN à boîtes C/D présentent des séquences internes conservées riches en GU de 20 à 40 nt de long et en AU beaucoup moins long et qui forment la bouche terminale des épingles à cheveux des ARN (Fig. 16B) (224). Localisés dans les corps de Cajal, des compartiments sub-nucléaires non délimités par une membrane, à l'instar des nucléoles, les scaARN interviennent notamment dans la maturation de certains snARN, tels que U1, U2, U4 ou U5, impliqués dans la machinerie d'épissage (218) (222). Cependant, des découvertes récentes appellent à une révision des rôles des scaARN, où il a été constaté qu'ils n'agissent pas exclusivement sur les snARN (225).

De plus, une fraction de snoARN/scaARN est transformée en des ARN plus courts (17 – 39 nt de long), communément désignés par le terme de petits ARN dérivés de snoARN (sdARN). Ils peuvent être générés à partir de snoARN/scaARN précurseurs à boîtes C/D ou à boîtes H/ACA (226). Un certain nombre de sdARN identifiés présentent les qualités de miARN (« snoARN-miARN ») ou de ARNpi (« snoARN-ARNpi ») (227) (205). En effet, des études ont montré l'existence d'une nouvelle classe de petits ARN (sdARN), produits de maturation des snoARN, en complexe avec des protéines AGO, protéines qui s'associent aux miARN au sein des particules RISC impliquées dans les voies de silençage de l'ARN (227). Par exemple, le sdARN *ACA45*, produit par le scaARN à boîtes H/ACA *ACA45*, a été le premier sdARN (ou snoARN-miARN) découvert et documenté (227). De même, certains snoARN présentent aussi des qualités de ARNpi, une autre classe d'ARN régulateur (205). Les snoARN-ARNpi peuvent fonctionner dans un mécanisme de qualité de l'ARN, comme c'est le cas pour le sdARN *piR30840* qui forme un complexe avec AGO4, PIWIL4, et TRAMP pour cibler le substrat de pré-ARNm pour une dégradation médiée par l'exosome (205). De même, des snoARN peuvent également exister sous forme d'hybrides avec les lncARN (snoARN-lncARN). Ils sont largement exprimés dans les cellules et les tissus et peuvent être produits par les snoARN à boîtes C/D ou à boîtes H/ACA (225) (228). Ces nouvelles molécules d'ARN sont principalement localisées près de leur site de transformation, au lieu d'être accumulées traditionnellement dans le nucléole ou les corps de Cajal (228). Ces snoARN-lncARN ont montré être impliqués dans la régulation génique et la pathogenèse (225) (228).

De nombreux snoARN à boîtes C/D et H/ACA dans divers organismes, appelés snoARN « orphelins », ont récemment été identifiés et semblent n'être complémentaire à aucune séquence d'ARN cibles connue. Cela

suggère que soit le répertoire de substrat des snoARN guides est beaucoup plus large que ce qui a été démontré à ce jour, soit que certains snoARN « orphelins » fonctionnent dans des processus cellulaires autres que la modification de l'ARN. Des séries d'études sur les profils d'expression des snoARN dans les cellules de mammifères ont démontré que le niveau de nombreux ARN "orphelins" à boîtes C/D et H/ACA varie selon les différents tissus. La variation des profils d'expression des snoARN suggère que ces ARN ont des fonctions spécifiques aux tissus (218).

Les snoARN, comme la grande majorité des ARNnc, ne portent pas d'activité catalytique intrinsèque et s'associent donc à des protéines catalytiques « aveugles », incapables de reconnaître leur cible, formant ainsi des complexes fonctionnels de petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP). Chaque RNP est composée d'un ARN guide à boîtes C/D ou H/ACA spécifique et d'un ensemble d'au moins quatre protéines avec la méthyltransférase, appelée fibrillarine (ou NOP1 chez la levure), NOP56, NOP58, et p15,5 kDa (ou SNU13 chez la levure, ou encore L7Ae chez les archées) pour les snoRNP à boîtes C/D et de la pseudouridine synthase, appelée dyskérine (ou Cbf5 chez la levure et les archées ou minifly chez les mouches), NOP10, NHP2 et GAR1 pour les snoRNP à boîtes H/ACA (218). Au sein de ces particules, les snoARN assurent une fonction de guide. En pratique, les séquences guides des snoARN reconnaissent et s'hybrident spécifiquement à la séquence de l'ARN cible par l'intermédiaire de liaisons de type Watson-Crick positionnant ainsi le nucléotide à modifier dans le site catalytique de l'enzyme, indiquant ainsi aux protéines partenaires la base exacte à modifier. Les complexes protéiques associés effectuent alors la modification appropriée sur le nucléotide identifié par les snoARN (218) (219).

## **ii. Architecture des différentes familles de snoRNP.**

Bien que le tout premier snoARN ait été identifié il y a plus de 60 ans, l'émergence de leur diversité anatomique et fonctionnelle date de ces trente dernières années (217). Après l'identification de plusieurs dizaines de snoARN, il est apparu qu'ils se répartissent en deux grandes classes qui possèdent des motifs de séquence distincts, fréquemment appelés « boîtes », conservés au cours de l'évolution : les snoARN à boîtes C/D et les snoARN à boîtes H/ACA, qui catalysent respectivement la 2'-O-méthylation et la pseudouridylation de l'ARN cible (218). De plus, ces snoARN nécessitent d'être associés à des protéines spécifiques formant ainsi des petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires (snoRNP) afin de pouvoir exercer leur fonction. Les complexes snoRNP à boîtes C/D et H/ACA sont présents des archées jusqu'aux vertébrés (217) (221). Ainsi, l'apparition des snoRNP est antérieure à la lignée eucaryote. Au sein de ces particules, les snoARN assurent une fonction de guide. Chez les eucaryotes et les archées, la composante snoARN sélectionne le site à modifier par complémentarité des bases avec les séquences de l'ARN cible. De plus, les substrats de ces petites RNP comprennent non seulement des pré-ARNr mais aussi des ARNt, snARN et même des ARNm.

## Les snoRNP à boîtes C/D.

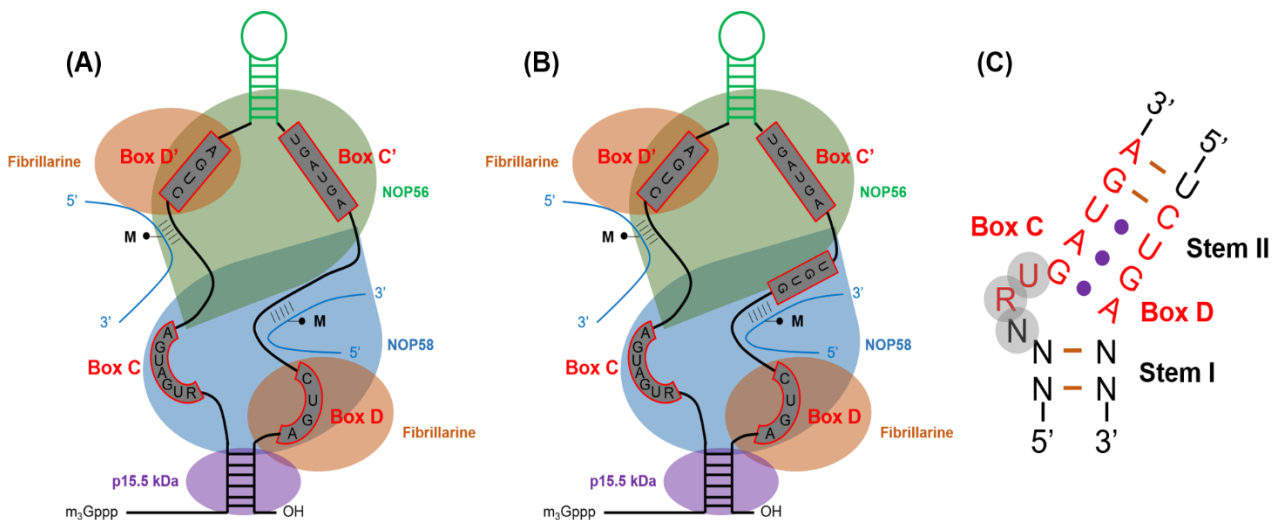
Les snoARN à boîtes C/D, généralement long de 70 à 90 nt, forment une boucle fermée qui abrite les boîtes conservées C (RUGAUGA), où R est une purine quelconque, et D (CUGA) proches des extrémités 5' et 3' du snoARN, respectivement (Fig. 16A) (217) (218). La plupart des snoARN à boîtes C/D contiennent une paire supplémentaire de boîtes C et D souvent moins conservées, désignées par les boîtes C' et D', qui sont localisées dans la région centrale de ces snoARN (217) (218). L'espacement entre les boîtes C' et D' est limité de 3 à 9 nt. Dans les quelques cas de snoARN plus séparés, les séquences intermédiaires forment une structure interne en tige-boucle, réduisant ainsi la distance entre les boîtes (Fig. 16A) (217) (218). Les boîtes C et D sont également rapprochées l'une de l'autre par la formation d'une courte hélice grâce à un appariement des extrémités 5' et 3'. Le motif C/D se plie ainsi en une structure particulière, appelée « kink-turn » (« K-turn »), qui est essentiel à la formation de la snoRNP et à l'activité de méthylation (218) (219). Le motif « K-turn » très conservé se caractérise par une organisation de type tige-boucle-tige comprenant environ 15 nt. Les deux courtes tiges entourent une bulle asymétrique : la tige I (ou tige canonique) contient des appariements Watson-Crick et la tige II (ou tige non-canonique) contient des interactions non-canoniques (liaisons hydrogènes), deux appariements G - A et un appariement U - U. Cette organisation provoque la formation d'un renflement de l'ARN d'environ 60°, notamment par la présence de trois nt de la boîte C non-appariés ainsi que des appariements non-canoniques (Fig. 16C) (218) (221).

Les snoARN et scaARN à boîtes C/D, aussi appelés snoARN/scaARN guides « anti-sens », dirigent la méthylation du groupement hydroxyle en 2' du ribose du nucléotide à modifier de l'ARN cible. Ils portent un ou deux séquences spécifiques anti-sens de 10 à 20 nt, qui sont complémentaires à celles des ARN cibles. Les snoARN guides sélectionnent les nucléotides du substrat à modifier en formant des interactions transitoires d'appariement de bases avec les séquences d'ARN cibles complémentaires. Ainsi, le snoARN qui forme une parfaite double hélice avec l'ARN cible positionne le résidu ciblé pour la méthylation à exactement 5 pb en amont de la boîte D ou D' (218) (219).

Il existe des snoARN à boîtes C/D qui diffèrent quelque peu des snoARN à boîtes C/D classiques, dans la mesure où il possède davantage de boîtes conservées (A, A', B) et par conséquent une structure différente. Parmi eux, nous avons les snoARN U3 et U8 qui sont impliqués dans le clivage nucléolytique du pré-ARNr. De plus, ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et possèdent une coiffe triméthylée (m<sup>3</sup>G). Le snoARN U8 possède également une structure particulière avec une extension en 5' (229) (230).

Le motif conservé des boîtes C/D jouent un rôle essentiel dans les réactions de modification de l'ARN guidées par les snoARN, ainsi que dans le traitement et l'accumulation nucléolaire des snoARN. Les snoARN à boîtes C/D accomplissent ces tâches à travers leur liaison à des protéines spécifiques du snoRNP. Quatre protéines spécifiques associées au snoARN C/D ont été identifiées : la fibrillarine/NOP1, NOP56, NOP58 et SNU13/p15.5kDa/L7Ae (218). Sur la base d'homologie de séquence avec leurs homologues bactériens, la fibrillarine a été identifiée comme étant la 2'-O-méthyltransférase (218) (221). Toutefois, elle est incapable

d'interagir directement avec le snoARN, indiquant qu'elle a besoin des protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D. En effet, l'association de la fibrillarine/NOP1 avec le snoARN guide C/D dépend de la formation d'un pont formé par les autres protéines (219) (221). Les protéines cœur sont essentielles à l'activité des snoRNP à boîtes C/D et à leur localisation nucléolaire. La déplétion de SNU13, NOP56, NOP58 ou NOP1 abolit la localisation nucléolaire des snoRNP C/D (219) (221). Alors que la fibrillarine/NOP1 n'est pas essentielle à la stabilité du snoARN C/D, les protéines NOP58 et SNU13/p15.5kDa/L7Ae le sont (219) (221). La protéine p15.5kDa/SNU13/L7Ae interagit directement avec le motif « K-turn » et sert ainsi d'échafaudage pour l'assemblage de la snoRNP au niveau des motifs C/D et C'/D' (219) (221). Les paires de bases G - A, A - G et U - U formées par les nucléotides conservés dans les motifs des boîtes C et D sont certes importantes pour la formation d'une structure secondaire « K-turn » fonctionnelle, mais aussi pour l'ancrage de la protéine de p15.5kDa/SNU13 (219) (221). Ce rôle dans l'initiation de l'assemblage du snoRNP C/D est conservé au cours de l'évolution. La liaison de L7Ae/SNU13/p15.5kDa à l'ARN permet ensuite le recrutement de NOP56 et NOP58, qui recrutent à leur tour la protéine catalytique pour former un complexe RNP fonctionnel et mature. Cependant, NOP56 s'associe au snoARN en présence de la fibrillarine/NOP1, alors que NOP58 peut se lier indépendamment à l'ARN. Structuellement, une molécule de fibrillarine et de NOP58 se lient aux séquences des boîtes C et D dans la tige supérieure du motif « K-turn », respectivement. NOP56 et une autre copie de la fibrillarine sont associées aux boîtes C' et D', respectivement (219) (221). De plus, la particule snoRNP chez les archées, appelée sRNP, ne contient que trois protéines : un homologue de la fibrillarine (NOP1), NOP5 (unique homologue de NOP56 et NOP58) et l'homologue de SNU13/p15.5kDa, la protéine ribosomale L7Ae (219) (221).



**Figure 16 – Structure des snoRNP à boîtes C/D.**

(A) Structure d'un snoRNP à boîtes C/D. Les positions et les séquences consensuelles des boîtes C (RGAUGA) et D (CUGA) conservées et des boîtes C' et D' correspondantes sont indiquées. Le motif C/D se couple et se plie en une structure particulière en hélice-bulle-hélice, appelée le motif « K-turn ». Les boîtes C' et D' sont généralement séparées de 3 à 9 nt. Cependant lorsque la distance est plus grande, une structure tige-boucle raccourcit la distance comme illustré ici en vert. Les lignes en bleu indiquent les séquences de l'ARN cible interagissant avec les éléments anti-sens du snoARN guide à boîtes C/D. Les snoARN à boîtes C/D forment ainsi de longues hélices de 10 à 20 nt avec l'ARN cible. Les nucléotides 2'-O-

méthylés situés à exactement 5 pb en amont de la boîte D ou D' sont indiqués comme suit : **M**. Les protéines NOP56, NOP58, p15.5 kDa et la fibrillarine s'associent au snoARN pour former le snoRNP à boîtes C/D. La liaison de la protéine p15.5 kDa au motif terminal « K-turn » des snoARN à boîtes C/D est un prérequis au recrutement des deux protéines NOP56 et NOP58, ainsi qu'aux deux copies de la méthyltransférase, la fibrillarine. **(B)** Structure d'un scaARN à boîtes C/D. En plus des boîtes conservées C et D, les scaARN C/D contiennent aussi une longue répétition « UG ». **(C)** Représentation schématique de la structure secondaire de la séquence consensus du motif en « K-turn » formé par les boîtes C et D. Ce motif est constitué d'une tige I contenant des appariements Watson-Crick (**marron**), d'une tige II contenant des interactions non-canoniques entre les deux paires de bases G – A et la paire U – U (**violet**), et d'une bulle asymétrique. Les nucléotides indiqués en **rouge** correspondent aux boîtes C et D. Les résidus non-appariés sont entourés en **gris**. **N**, n'importe quel nucléotide ; **R**, une purine quelconque. Source : Adaptée de (219).

### Les snoRNP à boîtes H/ACA.

Les snoARN à boîtes H/ACA ont une longueur médiane de 133 nt et adoptent une structure secondaire conservée formée de deux épingles à cheveux qui sont séparées par une région charnière d'ARN simple brin, appelée « hinge » (217) (218). La boîte H (ANANNA), où N représente tout nucléotide, se trouve dans la région charnière, tandis que la seconde tige-boucle est suivie par une queue terminale, formée de la boîte ACA à exactement trois nt en amont de l'extrémité 3' du snoARN (Fig. 17A) (217) (218).

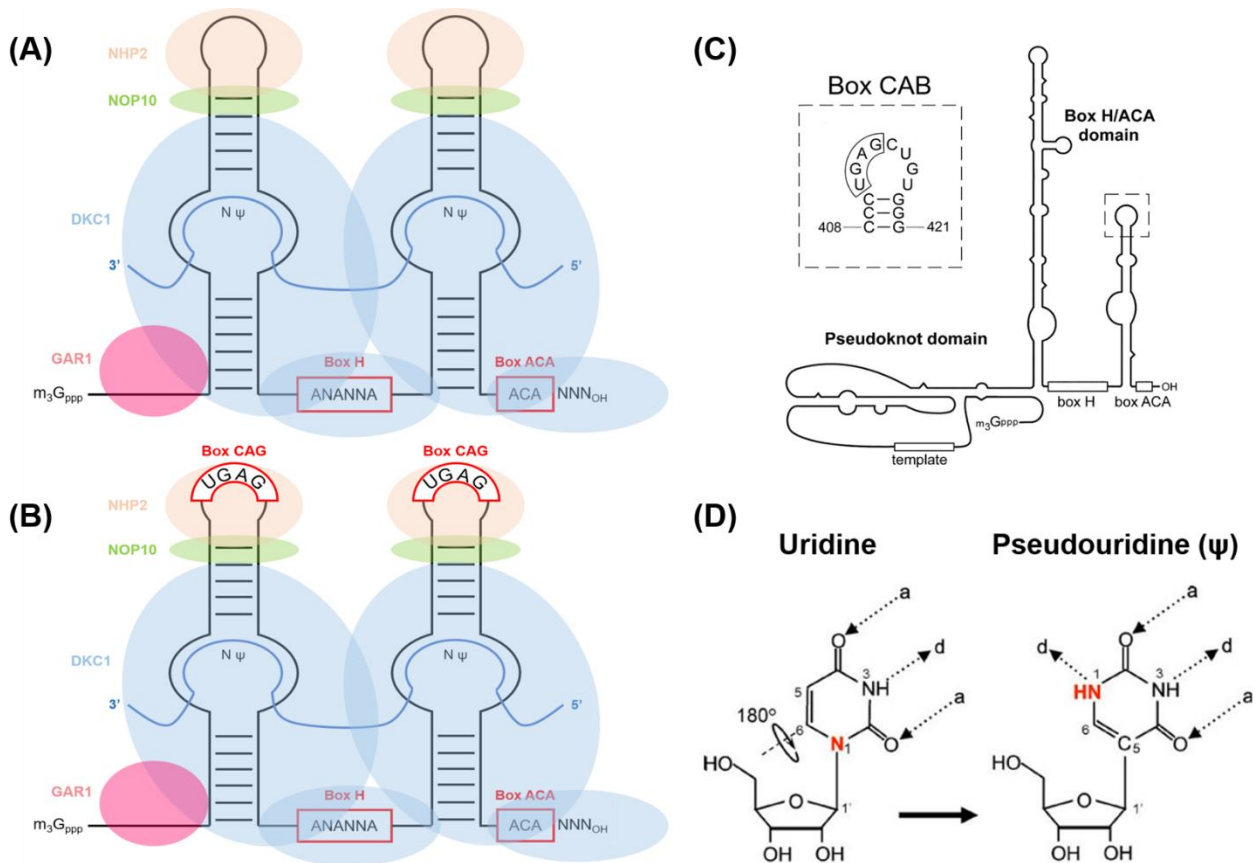
Les snoARN à boîtes H/ACA sont connus pour servir de guides pour l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine ( $\Psi$ ) par inversion du cycle pyrimidine (Fig. 17D) (217) (218). C'est la modification chimique la plus fréquente dans l'ARN, avec la 2'-O-méthylation. Contrairement aux autres modifications de l'ARN qui se contentent d'ajouter des groupes fonctionnels tout en laissant le nucléoside intact, la pseudouridylation implique la rupture de la liaison N-glycosidique et le détachement de la base du ribose, sa rotation de 180° et son rattachement pour former une liaison glycosidique carbone-carbone presque unique, c'est-à-dire l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine (Fig. 17D). Cette rotation ne modifie pas les propriétés d'appariement Watson-Crick par rapport à l'uridine, mais modifie la nature de la liaison glycosidique entre le ribose et la base (231). Les snoARN guides H/ACA identifient et positionnent l'uridine par appariement de bases avec l'ARN cible. Les séquences anti-sens du snoARN se lient par complémentarité à celles de l'ARN cible en formant deux courtes hélices de 3 à 10 nt de long, et en laissant deux nucléotides non-appariés dont l'uridine qui sera isomérisée en pseudouridine au niveau de la boucle interne localisée au milieu des deux épingles à cheveux, appelée la « poche de pseudouridylation » (Fig. 17A). L'uridine non-appariée à modifier et positionnée au centre de la poche de pseudouridylation est distante de 14 à 17 nt en amont de la boîte H ou ACA, et peut alors être le substrat de la pseudouridine synthase (218) (219). Bien que ce soit la structure de base et le mécanisme de guidage de la plupart des snoARN H/ACA, il existe des exceptions. Par exemple chez les archées, les snoARN à boîtes H/ACA sont simplement appelés petits ARN (sARN) et sont principalement composés d'une seule épingle à cheveux suivie de la boîte ACA et ne semblent pas du tout avoir de boîte H. Cependant, certains peuvent avoir jusqu'à trois épingles à cheveux (218).

Comme les snoARN à boîtes C/D, le composant ARN ne remplit pas une fonction catalytique directe, mais participe au positionnement correct de la pseudouridine synthase par rapport à l'ARN substrat pour la modification de la base. Les snoARN H/ACA sont ainsi liées à un ensemble distinct de protéines pour former des structures ribonucléoprotéiques à boîtes H/ACA (snoRNP H/ACA) stables et catalytiquement actives (Fig. 17A). Des analyses structurales ont montré la présence d'un ensemble de quatre protéines cœur sur chaque épingle à cheveux du snoARN à boîtes H/ACA (218) (219) (221). La pseudouridine synthase, responsable de la pseudouridylation, forme le noyau de la particule et porte plusieurs noms : NAP57 et dyskérine (DKC1) dans les cellules de mammifères, Cbf5 chez la levure et les archées, et minifly chez la mouche (Fig. 17A) (219). Elle a été identifiée à l'origine chez la levure et dans les cellules de mammifères avant que sa fonction ne soit connue et a ensuite révélé sa véritable identité par homologie de séquence à celle de la pseudouridine synthase bactérienne, TruB, qui catalyse l'isomérisation d'U55 dans la boucle T de l'ARNt (219) (221). Contrairement à la fibrillarine, DKC1 se lie directement au snoARN. En effet, DKC1 est formée du domaine catalytique N-terminal et du domaine PUA C-terminal. Le domaine PUA (pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase) est un domaine de liaison et est impliqué dans l'interaction de DKC1 avec l'ARN guide H/ACA. Les deux domaines forment une structure en L, avec un bras représentant le domaine catalytique N-terminal et l'autre le domaine PUA C-terminal (231). Les trois autres protéines de base sont NOP10, NHP2 et GAR1 (Fig. 17A). Comme DKC1, ces protéines sont très conservées et possèdent des orthologues chez la levure et les archées (219) (221) (231). En effet, les archées possèdent des homologues fonctionnels de chacune des protéines cœur des snoRNP, qui présentent une forte homologie de séquence avec celles des eucaryotes. Par conséquent, les mécanismes moléculaires de la formation des pseudouridines ( $\Psi$ ) et des 2'-O-méthylations sont anciens (2 à 3 milliards d'années) et ont été conservés au cours de l'évolution (231). Cependant, le composant ARN des sRNP est généralement plus court que celui des snoRNP eucaryotes (231). De plus, les expériences de déplétion chez la levure montrent que trois d'entre elles, DKC1, NOP10 et NHP2, sont essentielles et requises pour la stabilité du snoARN. Par contre, GAR1 qui n'est pas une protéine essentielle est quant à elle nécessaire à la fonction des snoARN à boîtes H/ACA (219) (221) (231). Plus précisément, NOP10 est un polypeptide qui se lie directement au domaine catalytique de DKC1 et permet ainsi sa stabilisation. De plus, il sert aussi de support à NHP2. NHP2 est une protéine avec un motif de liaison à l'ARN conservé phylogénétiquement et qui s'associe à l'ARN de manière non-spécifique. Contrairement au trimère DKC1-NOP10-NHP2 qui s'associe spécifiquement à l'ARN, GAR1 ne se lie pas directement au snoARN mais s'associe au complexe par interaction avec DKC1 (219) (221) (231).

En plus des snoARN à boîtes H/ACA traditionnels, l'ARN de la télomérase de mammifères, nécessaire à l'allongement et au maintien des télomères, se termine par un motif H/ACA et s'associe aux quatre mêmes protéines centrales pour former une RNP H/ACA (218) (232). La télomérase est une ribonucléoprotéine exerçant une activité de transcriptase inverse responsable de l'ajout d'un brin de séquences simples d'ADN répétées (TTAGGG) aux extrémités 3' des chromosomes linéaires (218) (232). Ce complexe renferme la sous-unité catalytique TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), l'ARN de la télomérase qui fournit la séquence



modèle pour la synthèse des télomères, ainsi que des sous-unités protéiques associées (Fig. 17C) (218) (232). Chez les vertébrés, l'ARN de la télomérase possède deux domaines structuraux majeurs. La partie de l'extrémité 5' de l'ARN de la télomérase se replie en structure « pseudoknot » conservée qui permet la liaison de la protéine TERT et qui abrite la matrice du télomère (Fig. 17C) (218) (232). La région de l'extrémité 3' du domaine de l'ARN de la télomérase possède toutes les caractéristiques structurales des snoARN à boîtes H/ACA (218) (232). Effectivement, ce domaine H/ACA contient à la fois les motifs de séquence primaire (boîtes H et ACA) et la possibilité d'adopter la structure secondaire conservée en forme d'épingle à cheveux, commune à tous les snoARN à boîtes H/ACA (Fig. 17C). De plus, les protéines RNP associées aux snoARN à boîtes H/ACA sont également des composants intégrants de la RNP télomérase (Fig. 17C) (218) (232). La boucle terminale de l'épingle à cheveux à l'extrémité 3' de l'ARN de la télomérase abrite en outre un signal de rétention spécifique aux corps de Cajal, la boîte CAB (UGAG), qui est partagé par les scaARN H/ACA, classant l'ARN télomérase comme un scaARN plutôt qu'un snoARN, et qui serait responsable de l'accumulation de l'ARN de la télomérase dans ces structures intranucléaires (Fig. 17C) (218) (232).



**Figure 17 – Caractéristiques structurales des snoRNP à boîtes H/ACA.**

(A) Représentation schématique d'un snoARN guide H/ACA hybridé à un ARN substrat dans sa poche de pseudouridylation. Les snoARN à boîtes H/ACA ont une structure secondaire conservée en épingle à cheveux – charnière – épingle à cheveux – queue. Chaque épingle à cheveux est composée d'une tige inférieure, d'une boucle interne appelée « poche de pseudouridylation », d'une tige supérieure et d'une boucle apicale. Les épingles à cheveux sont séparées par la boîte conservée H (ANANNA) et la dernière épingle à cheveux est suivie d'une queue terminale contenant la boîte conservée ACA à son extrémité 3'. La poche de pseudouridylation a une complémentarité de séquence avec l'ARN cible, formant avec

ce dernier deux courts duplexes de 3 à 10 nt qui enroule le nucléotide à modifier. Les lignes en **bleu** indiquent les séquences de l'ARN cible interagissant avec les éléments anti-sens du snoARN guide à boîtes H/ACA. Les résidus d'uridine sélectionnés pour la pseudouridylation sont indiqués comme suit :  $\Psi$ . Les snoRNP à boîtes H/ACA sont composés du snoARN et des quatre protéines cœur : la dyskérine (DCK1), NHP2, NOP10 et GAR1. **(B)** Schématisation de l'organisation structurale d'un scaARN à boîtes H/ACA. En plus des boîtes conservées H et ACA, les scaARN H/ACA contiennent un motif supplémentaire, appelée la boîte CAB (UGAG), au niveau de la boucle terminale des épingle à cheveux. Ce motif témoigne de la localisation spécifique des scaARN dans les corps de Cajal. **(C)** Structure schématique de l'ARN de la télomérase. La région abritant la matrice pour la synthèse de *nov* des télomères et les boîtes conservées H et ACA sont indiquées. Le motif de la boîte CAB situé dans la boucle terminale de l'épingle à cheveux est encadré. **(D)** Schéma de la réaction de pseudouridylation. La rotation de 180° de la base libre l'azote N-glycosidique de l'uridine comme donneur d'hydrogène supplémentaire de la  $\Psi$  (**rouge**). **N**, n'importe quel nucléotide. Source : Adaptée de (219).

### iii. Du petit ARN nucléolaire précurseur au complexe de petite ribonucléoprotéine nucléolaire fonctionnelle.

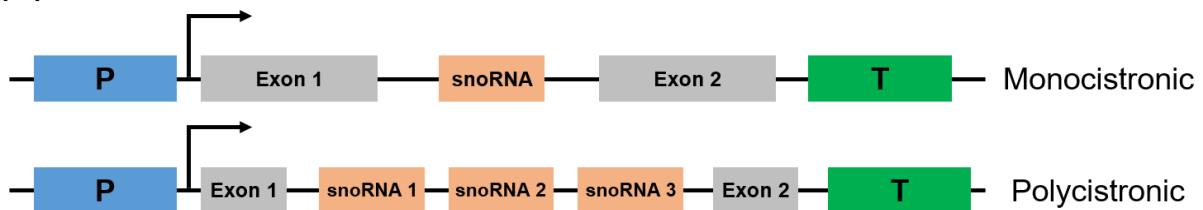
La biogenèse des snoRNP est un processus complexe, qui implique l'action coordonnée de facteurs de maturation, d'assemblage et de transport. Cette complexité est due aux divers modes d'organisation et de transcription des gènes de snoARN (Fig. 18, 19 et 20) (233). En bref, les snoARN sont d'abord synthétisés sous forme de long transcrits primaires (pré-snoARN) qui subissent ensuite des clivages nucléolytiques pour produire les snoARN matures. En plus des facteurs nécessaires à la maturation des snoARN, la biogenèse des snoRNP matures nécessite également de nombreux facteurs d'assemblage de la RNP. La maturation des RNP s'accompagne ensuite d'un mouvement intranucléaire permettant leur accumulation dans les compartiments appropriés où ils exercent leur fonction cellulaire, tels que le nucléole ou les corps de Cajal (les corps nucléolaires chez la levure) pour les scaARN et l'ARN télomérase (219).

#### **Transcription et maturation des snoARN.**

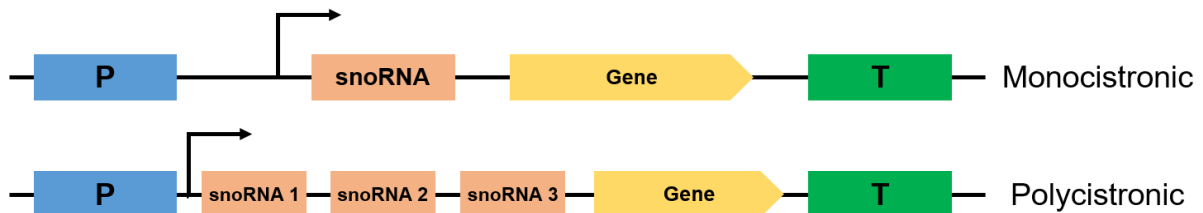
Les cellules eucaryotes utilisent différentes stratégies pour synthétiser les snoARN. Les séquences de snoARN peuvent être trouvées au sein d'unités transcriptionnelles qui leur sont propres, ou au sein d'un gène hôte dans ses régions introniques (Fig. 18) (233) (234). Dans ce cas, le snoARN n'est pas transcrit de façon indépendante mais à partir du promoteur du gène hôte. Chez les animaux (nématodes, mouches, mammifères), la production de snoARN à partir des introns est largement dépendante du processus d'épissage (220) (235) (236). Par contre, dans certains cas chez les plantes et la levure, la transcription des snoARN introniques semble être un phénomène indépendant de l'épissage (220) (235) (236). Cependant dans les deux contextes, les gènes des snoARN peuvent être seuls (monocistrons) ou organisés en groupes (polycistrons) (233). Dans le dernier

cas, les snoARN individuels sont générés à partir d'un précurseur ARN polycistronique qui subit alors des étapes de clivages enzymatiques (220) (233) (234).

### (A) Intronic snoRNA



### (B) Independent snoRNA



**Figure 18 – Organisation génomique des unités transcriptionnelles codant des snoARN.**

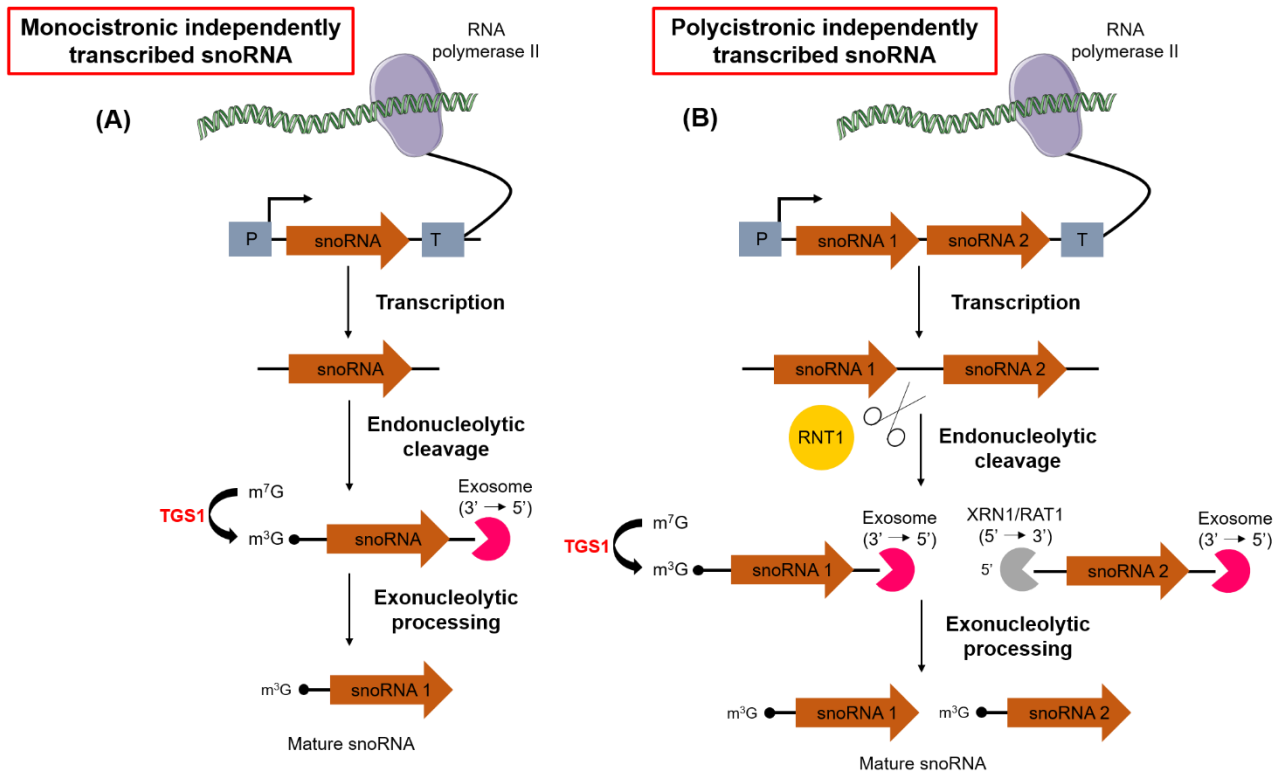
(A – B) Les snoARN sont générés, soit à partir de régions introniques (A), soit à partir d'unités de transcription indépendantes dotées de leur propre promoteur (B). Dans les deux contextes, les snoARN peuvent être organisés en monocistrons ou polycistrons. Fréquemment, les introns du même gène hôte voisin contiennent des snoARN avec une distribution de type « un gène par intron ». Dans ces cas, les séquences codant des snoARN ont été considérées comme « individuelles introniques », même si plusieurs snoARN différents peuvent provenir du même transcrit précurseur. **P**, promoteur ; **T**, terminateur. Source : Adaptée de (233).

- **Les gènes des snoARN avec des promoteurs indépendants.**

Bien que majoritairement introniques chez les vertébrés, certains snoARN, en particulier ceux impliqués dans le clivage des pré-ARNr (ex : snoARN U3, U8, etc...), la plupart des snoARN chez la levure, certains scaARN et l'ARN télomérase sont monocistroniques et transcrits par l'ARN polymérase II à partir de leur propre promoteur en tant que transcrits indépendants (Fig. 18B) (233). Comme mentionnés précédemment, la plupart des snoARN introniques suivent généralement la règle « un seul snoARN par intron » chez les vertébrés et la levure (233) (234) (235). Cependant chez d'autres organismes eucaryotes, les gènes codant des snoARN sont souvent retrouvés en « clusters ». En effet, une organisation polycistronique plus complexe, particulièrement fréquente chez les plantes, et une caractéristique également observée (bien qu'à un degré moindre) chez la levure, le nématode et la drosophile, repose sur un regroupement dans une même unité transcriptionnelle de plusieurs snoARN différents (220). Dans ce cas, la génération de snoARN individuels implique le traitement enzymatique des précurseurs d'ARN polycistroniques. Un tel traitement nécessite l'utilisation d'une combinaison d'endo- et d'exoribonucléases, les mêmes que celles requises pour la maturation des pré-snoARN monocistroniques (Fig. 19B) (234).

La plupart des promoteurs de gènes de snoARN sont reconnus par l'ARN polymérase II, mais quelques-uns possèdent des éléments de contrôle reconnus par la machinerie de transcription de l'ARN polymérase III (233). Les transcrits de l'ARN polymérase II se caractérisent par l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine ( $m^7GpppG$ ) au niveau de leur extrémité 5' triphosphate, qui leur confère de nouvelles propriétés. Cette coiffe est impliquée dans de nombreux processus et contribue aux événements de maturation. L'ARN de la télomérase, ainsi que plusieurs snoARN transcrits indépendamment portent une coiffe hyperméthylée obtenue après l'ajout d'une double méthylation en position 2 de la guanine (2,2,7-triméthylguanosine ( $m^{2,2,7}GpppN$  ou  $m^3GpppG$ )) par une méthyltransférase nucléolaire, la TGS1 (218) (233). Au cours du processus de maturation dans les corps de Cajal (les corps nucléolaire chez la levure), l'enzyme TGS1 est recrutée par les protéines de base NOP56/NOP58 pour les snoARN à boîtes C/D, et DKC1 pour les snoARN à boîtes H/ACA (237). De plus, la coiffe hyperméthylée est importante pour le transport nucléolaire des snoARN (237).

Après l'émergence de pré-snoARN monométhylé en 5' ( $m^7G$ ) au cours de la transcription par l'ARN polymérase II, les ARN naissants monocistroniques subissent des modifications, telles que l'élimination de l'extension en 3' par l'exosome, ainsi que la maturation de l'extrémité 5' avec une hyperméthylation ( $m^3G$ ) de la coiffe  $m^7G$  médiée par la TGS1 (Fig. 19A). Cependant, les snoARN présents dans des unités polycistroniques nécessitent des étapes intermédiaires de maturation des pré-snoARN pour produire des molécules matures (Fig. 19B) (219) (234) (235) (238). D'abord, le transcrit naissant polycistronique subit une excision catalysée par l'endoribonucléase RNT1, l'orthologue de la RNase III bactérienne, afin de donner des pré-snoARN individuels (Fig. 19B). Les extrémités libérées fournissent alors des points d'entrée pour les exonucléases 5' → 3' avec la RAT1 (XRN1 chez la levure) et 3' → 5' avec l'exosome, qui éliminent les nucléotides excédentaires et ainsi générer un snoARN mature (Fig. 19B) (219) (234) (235) (238). En effet, certains snoARN perdent leur coiffe  $m^7G$  car ils sont transcrits avec une longue extension 5' (150 - 200 nt) qui forme une tige-boucle reconnue et clivée par l'endonucléase RNT1, avant d'être maturés par une activité exonucléolytique à leur extrémité 5' (Fig. 19B) (238). Sinon, les snoARN toujours en possession de leur coiffe  $m^7G$  sont pris en charge par le facteur de transport PHAX dans le noyau pour les orienter vers les corps de Cajal (les corps nucléolaires chez la levure), où ils subissent la triméthylation de la coiffe ( $m^3G$ ) par l'enzyme TGS1 (Fig. 19) (237).



**Figure 19 – Etapes de maturation des snoARN indépendants.**

**(A – B)** Quelques snoARN sont transcrits dans le noyau à partir d'unités de transcriptions indépendantes. **(A)** Une fois transcrits par l'ARN polymérase II, les transcrits monocistroniques subissent un clivage exonucléolytique de leur extrémité 3' et une hyperméthylation de leur coiffe 5', qui donne alors naissance à des snoARN matures avec une coiffe triméthylée ( $m^3G$ ) en 5' et une terminaison 3'-hydroxyl. **(B)** Cependant, les pré-snoARN polycistroniques subissent d'abord un découpage endonucléolytique par la RNT1, un orthologue de la RNase III bactérienne. Les pré-snoARN individuels obtenus subissent ensuite la formation d'une coiffe hyperméthylée ( $m^3G$ ) par l'enzyme TGS1 ou encore une digestion exonucléolytique des extrémités 5' par la RAT1/XRN1 et l'élimination de l'extension 3' par l'exosome et ainsi générer des snoARN matures. **P** : Promoteur ; **T** : Termineur. Source : Adaptée de (234) et (238).

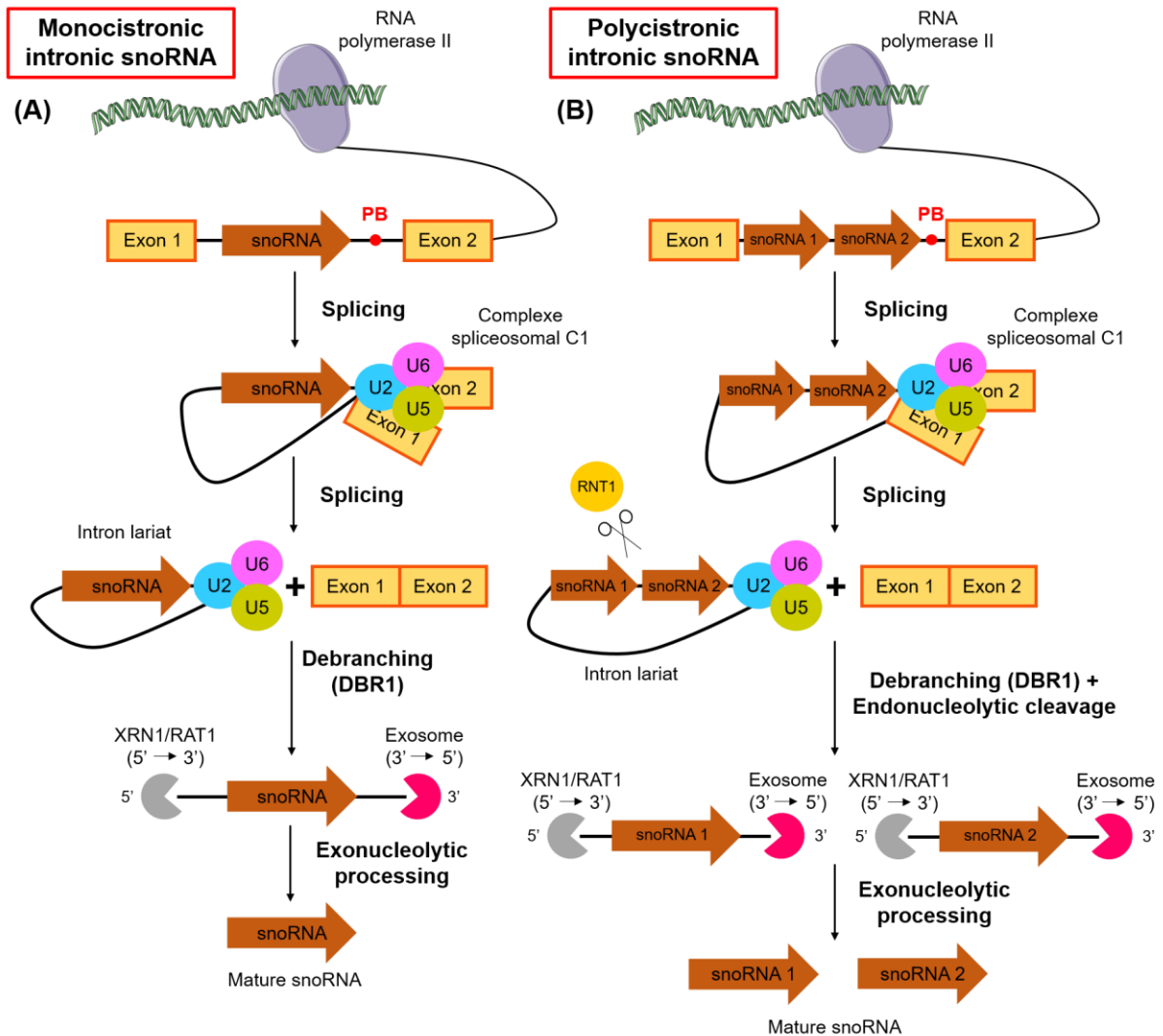
- **Les gènes des snoARN introniques.**

La majorité des snoARN guides chez les animaux (nématodes, mouches, mammifères) et quelques-uns chez la levure sont intégrés dans les introns d'ARNm (Fig. 18A) (217) (233). Ils peuvent être trouvés soit dans une organisation « un snoARN par intron » (monocistron), ou en clusters de deux ou plusieurs unités codantes situés dans le même intron (polycistron) (Fig. 18A) (217). La transcription des gènes codant les snoARN est donc dépendante de la transcription du gène hôte contenant cette séquence. Souvent, les séquences hôtes des gènes de snoARN introniques ont des relations directes avec les fonctions traductionnelles, notamment dans l'assemblage des ribosomes ou dans les processus nucléolaires (217) (220). Certains snoARN ont également la particularité d'être codé dans le génome au sein de séquences introniques dont le gène hôte ne code pas une protéine mais un ARNnc, notamment les lncARN (217) (233).

Plutôt que d'être exprimés à partir de gènes simples, la plupart des snoARN connus d'animaux sont codés après la transcription à partir de séquences introniques de pré-ARNm, qui codent les protéines dans leurs séquences exoniques, ou de lncARN (217) (233). Après transcription du gène hôte par l'ARN polymérase II, un pré-ARNm est synthétisé puis épissé dans le noyau de la cellule pour donner lieu à un ARNm dit mature. Les ARN transcrits subissent alors une série d'étapes de coupure et de ligature (épissage) qui conduisent à l'élimination de certaines régions dans l'ARN final, les introns, afin de conserver uniquement les exons. Cependant dans certains cas, les introns sont conservés pour leurs séquences codantes des snoARN. La production de snoARN introniques dépendent largement de la machinerie d'épissage. Cependant, chez d'autres cas, la transcription des snoARN à partir d'introns sont indépendants de ce mécanisme (236). Par exemple chez l'Homme, les snoARN à boîtes C/D sont préférentiellement situés à au moins 50 nt en aval du point de branchement (PB) et à environ 70 nt en amont du site d'épissage 3' de l'intron, alors que les gènes des snoARN à boîtes H/ACA ne possèdent pas d'emplacement précis mais sont plutôt éparpillés de manière aléatoire par rapport au site d'épissage à proximité de l'extrémité 3' (235).

Les snoARN introniques peuvent suivre deux voies alternatives de maturation selon l'organisation génomique des unités transcriptionnelles codant des snoARN. Les pré-snoARN sont maturés après la réaction d'épissage libérant l'intron sous la forme d'un lasso (Fig. 20). Leur libération dépend en partie de l'épissage du pré-ARNm et de leur excision de l'intron en forme de lasso qui doit être ouvert par l'enzyme DBR1 (Fig. 20). Après débranchement, les pré-snoARN sont traités pour éliminer les nucléotides en excès à chaque extrémité par l'activité d'exonucléases et ainsi obtenir des snoARN matures (219) (234) (235) (238). Les enzymes XRN1/RAT1 sont responsables des coupures exonucléolytiques 5' → 3', alors que les épisodes de digestions exonucléolytiques 3' → 5' sont pris en charge par l'exosome nucléaire (Fig. 20A) (219) (234) (235) (238). Le découpage exonucléolytique des introns épissés et débranchés donne ainsi naissance à des snoARN matures avec des terminaisons 5'-monophosphate et 3'-hydroxyl.

Dans le cas de cluster, les snoARN individuels sont libérés du transcrit polycistronique par un clivage endonucléolytique entre chaque snoARN (Fig. 20B) (219) (235) (238). Ils suivent une voie de traitement similaire à celle décrite pour les snoARN transcrits indépendamment. La libération des snoARN est initiée par l'action de l'endonucléase RNT1, l'orthologue de l'enzyme RNase III bactérienne, et conduit ainsi à la séparation des différents cistrons (Fig. 20B). Cette étape permet ensuite aux exonucléases XRN1/RAT1 de digérer les séquences flanquantes du snoARN jusqu'à l'extrémité 5' mature, alors qu'en 3' du pré-snoARN la protéine RNT1 crée un site d'entrée pour l'exosome qui dégrade l'ARN jusqu'à l'extrémité 3' mature (Fig. 20B) (234) (235). Dans tous les cas, c'est la liaison des protéines spécifiques du cœur de la particule RNP au niveau des motifs conservés (C/D ou H/ACA) qui définiront et protégeront les extrémités matures du snoARN de la dégradation exonucléolytique (219).



**Figure 20 – Voie de synthèse des snoARN introniques.**

(A – B) Les différentes voies de maturation des snoARN introniques définies par leur organisation génomique. (A) La grande majorité des snoARN de type C/D et H/ACA sont traités à partir de régions introniques de pré-ARNm. Les pré-snoARN introniques sont générés à partir d'introns épissés sous forme de « lasso ». Après débranchement de l'intron par l'enzyme DBR1, le traitement consiste en une digestion exonucléolytique par les protéines RAT1/XRN1 à l'extrémité 5' et par l'exosome nucléaire en 3' du snoARN. Les exonucléases avancent le long de l'ARN jusqu'à ce qu'elles soient bloquées par la structure snoRNP. (B) Le modèle précédent illustre l'exemple d'un snoARN individuel (un intron = un snoARN). Cependant lorsque les introns sont organisés en clusters (polycistrons), un clivage endonucléolytique par la RNT1 est nécessaire avant la digestion exonucléolytique afin de séparer les différents transcrits de snoARN à partir du précurseur d'ARN polycistronique. **PB** : Point de branchement ; **P** : Promoteur ; **T** : Termineur ; **U2, U5** et **U6** : les snRNP U2, U5 et U6 du complexe spliceosomal C1. Source : Adaptée de (234) et (238).

### 🚦 Assemblage et trafic intracellulaire des snoRNP à boîtes C/D et H/ACA.

Normalement après la réaction d'épissage, les introns sont excisés sous forme de « lasso » qui sont ouverts et ensuite dégradés. Cependant, les snoARN échappent à cette dégradation en formant un complexe protéique pour protéger leurs extrémités contre la dégradation exonucléolytique (235). Les premières étapes

de l'assemblage des snoRNP sont physiquement et fonctionnellement couplées à la synthèse ou l'épissage du pré-ARNm du gène hôte. Les snoRNP en maturation suivent ensuite un processus de trafic intranucléaire, dirigé par des facteurs de transport spécifiques. En effet, l'assemblage des snoRNP se produit en grande partie dans le nucléoplasme. Cependant, de nombreuses étapes ont lieu dans les corps de Cajal chez les eucaryotes supérieurs ou les corps nucléolaires chez la levure, avant l'enrichissement des snoRNP matures dans le nucléole (237).

La biogenèse de snoRNP à boîtes C/D et H/ACA requiert l'intervention de plusieurs facteurs d'assemblage ayant des rôles multiples. Notamment, ils facilitent la formation d'une pré-RNP formée par les protéines cœur assemblées en l'absence de l'ARN, stabilisant ainsi les intermédiaires d'assemblage labiles. Ils fournissent aussi un échafaudage structural et organisent les protéines d'une manière qui favorise l'assemblage spécifique avec certains ARN. Enfin, ils empêchent la liaison des ARN non-spécifiques lors de l'assemblage des snoRNP. Par conséquent, en interagissant à la fois avec les protéines cœur des RNP et avec les composants ARN des RNP, les facteurs d'assemblage assurent l'efficacité, la spécificité et le contrôle de la qualité de la production des RNP (235) (237).

Bien que les snoRNP à boîtes C/D et H/ACA ont des structures non communes entre elles, des études récentes ont notamment révélé que le même mécanisme est impliqué dans l'assemblage de ces RNP. En effet, les travaux ont montré la nécessité d'intervention et l'importance du système chaperon/co-chaperon HSP90/R2TP dans l'assemblage et le trafic intranucléaire des snoRNP à boîtes C/D et H/ACA (237). Il utilise des adaptateurs spécifiques pour interagir avec les protéines des deux familles de snoRNP. Le complexe R2TP est formé de PIH1D1 (NOP17 chez la levure), RPAP3 (TAH1 chez la levure) et de deux protéines appartenant à la superfamille des protéines AAA<sup>+</sup> (ATPases Associated with diverse Activities), possédant à la fois des activités ATPases et potentiellement hélicase, RUVBL1 et RUVBL2 (237). PIH1D1 et RPAP3 servent de protéines adaptateurs/recruteurs et forment un hétérodimère. RPAP3 est en contact direct avec l'extrémité C-terminale de la chaperonne HSP90 et agissent ensemble pour stabiliser PIH1D1 (237). Comme RPAP3, PIH1D1 interagit aussi avec HSP90 mais également avec RUVBL1 et RUVBL2 par son domaine C-terminal (237). RUVBL1 et RUVBL2 s'organisent quant à eux en structure dodécamérique qui interagissent, dépendants de l'ATP, avec l'hétérodimère PIH1D1/RPAP3 (Fig. 21 et 22) (237). Tous les composants du complexe R2TP jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des snoRNP. Ils interviennent dès les étapes précoces de la biogenèse des snoRNP, lorsque des complexes de nature uniquement protéique sont pré-assemblés dans le cytoplasme (237).

- **Le cheminement de l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes.**

Quatre protéines, conservées chez la levure et les archées, font partie du cœur de la particule snoRNP à boîtes C/D. Elle contient la 2'-O-méthyltransférase, appelée fibrillarine (NOP1 chez la levure), NOP58, NOP56 et une protéine de p15.5 kDa (SNU13 chez la levure ou encore L7Ae chez les archées) (218). Des études ont



montré que l'assemblage des particules snoRNP à boîtes C/D est initié par la fixation spécifique de la protéine p15.5 kDa sur le motif en « K-turn » formé par les boîtes C et D. Cette liaison a permis en outre le recrutement du dimère NOP58/Fibrillarine, l'interaction avec NOP56/Fibrillarine qui sont associés à l'extrémité C'/D' et la formation de la structure mature active (219) (235) (237).

L'assemblage des snoRNP à boîtes C/D nécessite plusieurs facteurs d'assemblage avec notamment le complexe chaperonne HSP90/R2TP et des facteurs spécifiques aux snoRNP C/D, tels que NUFIP1 (RSA1 chez la levure), ZNHIT3 (HIT1 chez la levure) et ZNHIT6 (BCD1 chez la levure) (237). Au cours de la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D, un complexe multi-protéique exclusif contenant les protéines p15.5 kDa et NOP58 est préformé à l'aide du système chaperonne HSP90/R2TP, et est ensuite chargé sur le pré-snoARN (Fig. 21). Dans ce nouveau complexe, les deux protéines centrales NOP58 et p15.5 kDa sont des clientes de la protéine chaperonne HSP90 et s'associent aux sous-unités RUVBL1 et RUVBL2 du complexe R2TP, et aussi aux facteurs d'assemblage NUFIP1, ZNHIT3 et ZNHIT6 (237). Les protéines forment ainsi un échafaudage qui sert de médiateur pour la biogenèse de la snoRNP (Fig. 21).

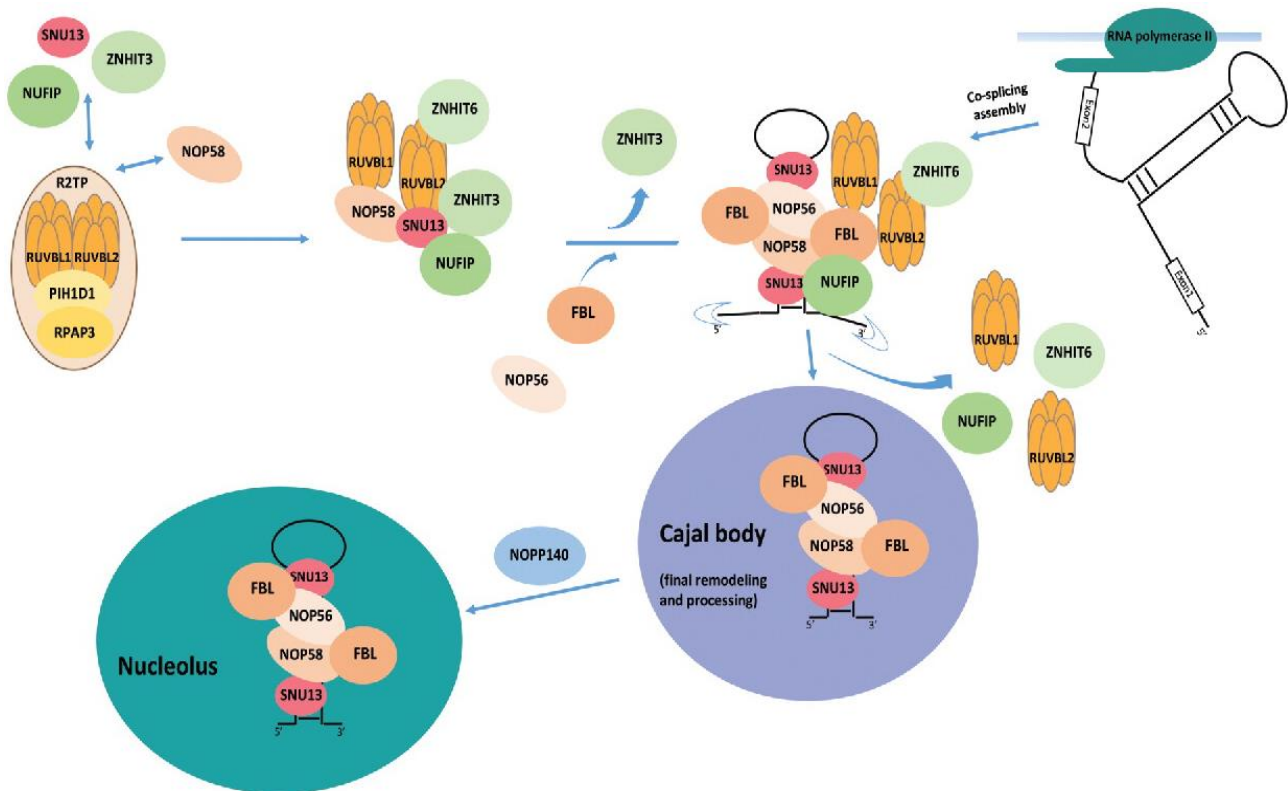
Alors que dans le complexe R2TP, RUVBL1/2 sont associées à l'hétérodimère PIH1D1/PP3, seules RUVBL1 et RUVBL2 sont retrouvées dans ce nouveau complexe protéique (Fig. 21). En effet lorsque les ATPases RUVBL1/2 se lient intimement à ZNHIT3 et ZNHIT6, cette interaction provoque leur libération du complexe R2TP (237). Ainsi, le rôle du système HSP90/R2TP serait de libérer RUVBL1/2 du complexe afin de les charger de manière ATP dépendante aux premières étapes de formation des pré-snoRNP (sans l'implication de l'ARN) sur les protéines centrales NOP58 et SNU13 grâce à l'intervention des facteurs PIH1D1 et PP3 (237). De plus, les protéines RUVBL1/2 du complexe R2TP ont été supposées contribuer au remodelage de la snoRNP immature, car elles réalisent des interactions dépendant de l'ATP avec les protéines des snoRNP à boîtes C/D et avec les autres facteurs d'assemblage. Quant à ZNHIT3 et ZNHIT6, il semblerait qu'elles jouent le rôle d'adaptateurs/recruteurs entre le complexe R2TP (les protéines RUVBL1/2) et leurs clientes, et aussi de régulateurs de leur activité ATPase (237). ZNHIT3 forme un hétérodimère avec NUFIP1 qui se lie ensuite à PIH1D1, et s'associe aussi à p15.5 kDa (237). NUFIP1 a été proposée pour réguler l'interaction des protéines NOP56 et NOP58, ainsi que la protéine de liaison à l'ARN, la p15.5 kDa (237).

Après la formation du complexe spliceosomal C1 sur les intermédiaires en « lasso » de la réaction d'épissage, la p15.5 kDa se lie spécifiquement au motif « K-turn » du pré-snoARN à boîtes C/D intronique grâce à l'intervention du facteur d'assemblage NUFIP1 (Fig. 21) (235) (237). Ce recrutement dépend exclusivement des facteurs d'épissage spécifiques du complexe spliceosomique C1 et explique le besoin d'un emplacement approprié par rapport au point de branchement pour une maturation efficace (235) (237). De plus, le facteur NUFIP1 est requis pour l'assemblage du snoRNP en interagissant avec la séquence du snoARN naissant. Ainsi, ces résultats indiquent que la p15.5 kDa est activement recrutée vers les snoARN à boîtes C/D introniques par un mécanisme dépendant de l'épissage (235) (237). De plus, l'épissage faciliterait également le repliement correct du motif « K-turn » pour permettre l'association de p15.5 kDa (219) (235) (237). Après liaison du complexe protéique au pré-snoARN, les autres protéines composant le snoRNP à boîtes C/D, NOP56 et la

Fibrillarine, viennent s'associer au complexe préformé accompagné de la libération rapide de ZNHIT3, alors que NUFIP1 et RuvBL1/2 resteraient liées jusqu'à un stade avancé de la biogenèse (Fig. 21) (235) (237). La dissociation de ZNHIT3 mènerait à un renforcement de l'association de la Fibrillarine au complexe qui est déclenchée par l'interaction de NOP58 avec le motif C/D. Le complexe snoRNP subit ainsi un réarrangement structurel qui stabilise de manière significative l'association des protéines de la boîte C/D (237).

Avant de s'accumuler dans le nucléole, les snoRNP à boîtes C/D réalisent des passages par des structures spécialisées, comme les corps de Cajal chez les vertébrés ou les corps nucléolaires chez la levure après l'assemblage des protéines constitutives (Fig. 21) (235) (237). Ces structures contiennent l'hyperméthylase TGS1 qui catalyse la réaction d'hyperméthylation de la coiffe m<sup>7</sup>G de certains snoARN. A ce stade, les facteurs d'assemblage RUVBL1/2, ZNHIT6 et NUFIP1 quittent à leur tour la pré-snoRNP avant leur arrivée dans les corps de Cajal (Fig. 21) (237). Cette élimination des chaperons d'assemblage permet ainsi d'obtenir une particule de snoRNP mature et catalytiquement active. Chez les vertébrés, les éléments des boîtes conservées C/D, mais également leur position correcte au sein de l'ARN, se sont avérés être nécessaire et suffisant pour la localisation nucléolaire des snoARN (219) (235). Les protéines constitutives p15.5 kDa, Fibrillarine, NOP56 et NOP58, sont aussi importantes pour la localisation nucléolaire. En effet, des études ont montré que l'appauvrissement de ces protéines, ainsi que l'absence du motif C/D, conduit à une accumulation de l'ARN hors du nucléole. De plus, seules les snoRNP correctement assemblées sont adressées au nucléole, car la localisation nucléolaire de la Fibrillarine et NOP58 est dépendante de l'expression des autres protéines constituantes de la RNP (235) (237). L'accumulation nucléolaire des snoRNP à boîtes C/D est aussi régulée par la protéine NOPP140, fonctionnant comme navette entre les corps de Cajal et le nucléole (Fig. 21) (237).

PHAX et CRM1 (ou exportine 1) sont aussi deux autres facteurs importants dans le transport et la localisation intranucléaire des snoRNP. Ils sont connus pour participer à la biogenèse des snoARN coiffés m<sup>7</sup>G, en assurant leur export vers les corps de Cajal et le nucléole (235) (237). Les protéines PHAX et CRM1 interviennent de manière séquentielle dans le transport du snoRNP. Le facteur de transport PHAX s'associe dans un premier temps au snoARN porteur de la coiffe m<sup>7</sup>G et les orientent vers les corps de Cajal, où ils subissent la triméthylation de la coiffe (235) (237). Suite à cette modification, PHAX se dissocie des ARN porteurs d'une coiffe hyperméthylée (m<sup>3</sup>G). Les snoARN recrutent ensuite la protéine CRM1 et les dirigent vers le nucléole (235) (237). Tous les ARN présentant une coiffe m<sup>7</sup>G sont transportés par ce système PHAX/CRM1, comme les snoARN U8, U13 ou bien l'ARN du complexe télomérase (235) (237).



**Figure 21 – Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D.**

Au cours de la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D, un complexe protéique préformé contenant les protéines p15.5 kDa et NOP58 se lie au pré-snoARN avec l'aide du système chaperon HSP90/R2TP et provoque le recrutement des autres protéines constitutives. Les particules de pré-snoRNP formées sont ensuite dirigées vers les corps de Cajal, où un traitement final peut avoir lieu (hyperméthylation de la coiffe m<sup>7</sup>G par la TGS1). Les snoRNP catalytiquement actives sont ensuite transférées vers le nucléole avec l'intervention de la protéine NOPP140, où elles fonctionnent dans la 2'-O-méthylation des riboses sur les ARN cibles. Les snoARN à boîtes C/D contiennent quatre protéines essentielles et conservées au cours de l'évolution, la Fibrillarine (2'-O-méthyltransférase), NOP56, NOP58 et p15.5 kDa. Les symboles **bleus** aux extrémités du pré-snoARN représentent les enzymes exonucléolytiques XRN1/RAT1 en 5' et l'exosome en 3'. Source : Prise de (237).

- **Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA chez les eucaryotes.**

Comme pour les snoARN à boîtes C/D, un ensemble de protéines spécifiques s'associe au snoARN à boîtes H/ACA pour former une particule snoRNP H/ACA stable et fonctionnelle. Quatre protéines conservées forment ainsi le cœur de la particule H/ACA : la pseudouridine synthase, appelée dyskérine (DKC1) ou Cbf5p chez la levure et les archées ou encore minifly chez les mouches, NHP2, NOP10 et GAR1 (218). Cependant, il existe d'autres protéines qui s'associent transitoirement aux snoRNP sans faire partie des particules matures et qui aident notamment au recrutement des protéines cœur et à l'assemblage de la particule. Au moins deux facteurs d'assemblage conservés, SHQ1 et NAF1, sont importants pour la biogenèse des snoRNP à boîtes H/ACA (235) (237).

La première étape de l'assemblage du snoRNP à boîtes H/ACA est l'interaction étroite de SHQ1 avec la sous-unité catalytique de DKC1 (Fig. 22). Rapidement après sa synthèse, DKC1 s'associerait à SHQ1 pour empêcher physiquement sa liaison avec des ARN non-spécifiques avant son association avec les ARN guides. De plus, DKC1 seule n'est pas stable et son interaction avec SHQ1 dès sa synthèse le protégerait ainsi de toute dégradation (237). SHQ1 contient deux domaines conservés bien définis, un domaine N-terminal CHORD et SGT1 (CS) et un domaine C-terminal spécifique de SHQ1 (SSD). Sa fonction est d'occuper la même position qu'un snoARN H/ACA sur la DKC1 dans la RNP mature (231) (237). En effet, le domaine SSD interagit avec les domaines de liaison à l'ARN de la DKC1. En outre, le domaine N-terminal de la SHQ1 se lie aux mêmes domaines de la DKC1, mais du côté opposé, formant ainsi une boucle serrée autour de la protéine DKC1 (231) (237).

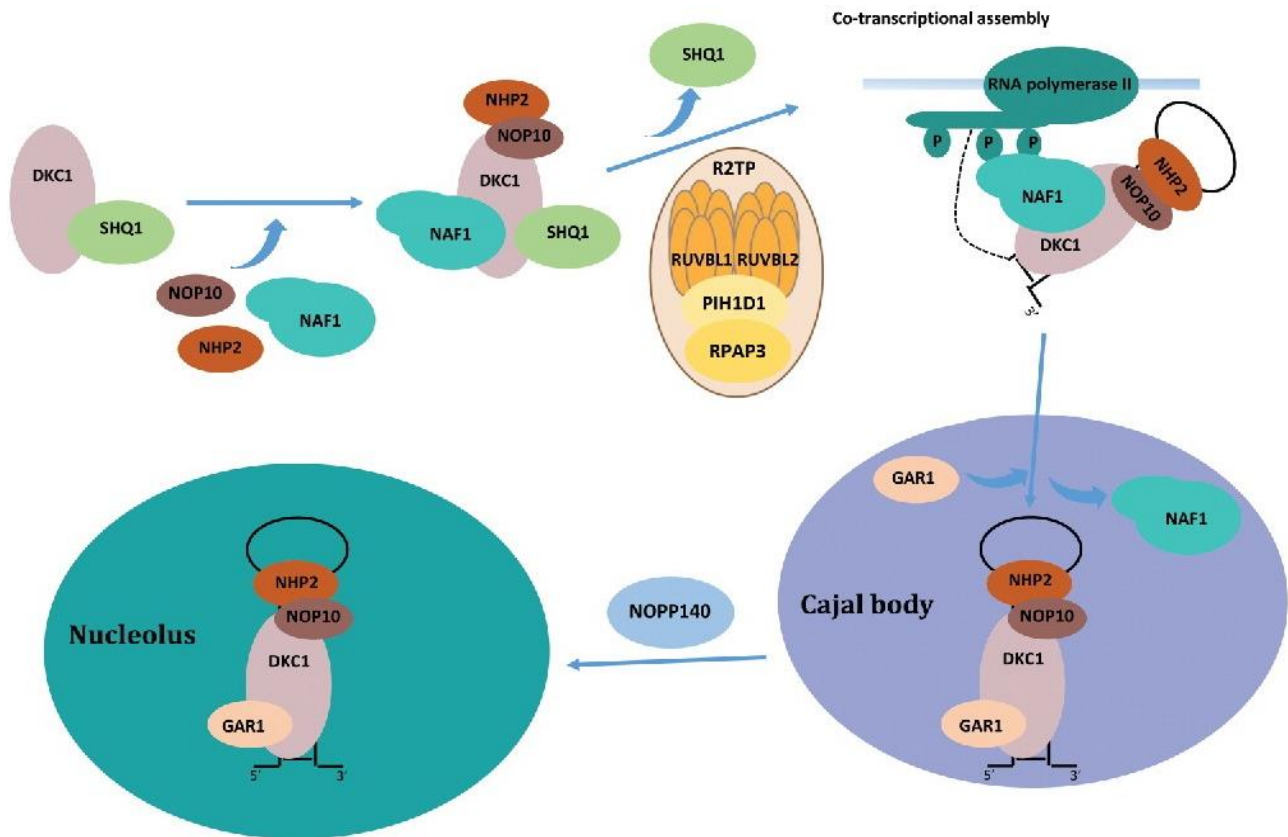
L'assemblage des snoRNP H/ACA se poursuit alors par le recrutement indépendant des autres protéines NHP2 et NOP10 au sein du complexe DKC1-SHQ1, et aussi du facteur d'assemblage NAF1, où il joue un rôle central dans le recrutement des protéines cœur sur le snoARN en cours de synthèse. NOP10 et NAF1 se lient indépendamment à deux faces orthogonales du domaine catalytique de DKC1, alors que NHP2 s'associe par interaction protéine-protéine à NOP10 (Fig. 22) (237).

Contrairement aux snoARN à boîtes C/D introniques, les gènes des snoARN à boîtes H/ACA humains ne montrent pas une localisation préférentielle à proximité de l'extrémité 3' de leurs introns hôtes. En conséquence, la liaison des protéines H/ACA est liée à la transcription de l'ARN polymérase II (219) (234) (235) (237). Cette connexion est réalisée par NAF1, qui interagit directement avec le domaine C-terminal phosphorylé (CTD) de l'ARN polymérase II (Fig. 22) (237). Vu que les introns sont très instables après leur débranchement, les protéines cœur des RNP H/ACA et les facteurs d'assemblage sont activement recrutés sur le pré-ARNm naissant dans le but de maximiser l'efficacité de l'expression des ARN introniques. Avant l'association de NAF1 avec l'ARN guide au site de transcription, la SHQ1 est libérée du complexe protéique à l'aide du système chaperon R2TP/HSP90 et permet ainsi la liaison de la DKC1 au pré-snoARN H/ACA naissants (Fig. 22). Au site de transcription du snoARN à boîtes H/ACA, les protéines NHP2 et NOP10 ainsi que le facteur d'assemblage NAF1 sont également présents (Fig. 22) (237). Le complexe R2TD/HSP90 est important à ce stade du processus, car les ATPases RUVBL1/2, lors de la dissociation de la SHQ1 des protéines de base, permettent de stabiliser le complexe protéique pré-snoRNP (231) (237).

GAR1 ne se trouve pas encore au site de transcription avec les autres protéines de base, mais est concentrée dans le nucléole et les corps de Cajal, où résident les snoRNP à boîtes H/ACA matures. Cette protéine s'associe plus tard dans le processus de maturation via un événement de remodelage qui consiste en l'échange de NAF1 contre GAR1, après que la particule en voie de maturation ait quitté le site de transcription pour les corps de Cajal (Fig. 22) (237). NAF1 permet de maintenir la machine de pseudouridylation inactive jusqu'au remplacement de NAF1 par GAR1, empêchant ainsi la modification des cibles ARN aléatoires jusqu'à la formation des particules matures (231) (237).

Comme les snoARN C/D, les séquences conservées des boîtes H et ACA reliées par une tige boucle

sont nécessaires à la localisation nucléolaire du snoRNP (219) (235). Tandis que les scaRNP H/ACA sont retenues dans les corps de Cajal, les snoRNP à boîtes H/ACA matures sont ensuite transportées vers le nucléole. Comme pour le trafic intranucléaire des particules RNP à boîtes C/D, la protéine NOPP140 est nécessaire pour effectuer ce transfert (Fig. 22) (237). Les facteurs PHAX et CRM1 sont également sollicités pour le trafic intranucléaire des snoARN à boîtes H/ACA possédant une coiffe m<sup>7</sup>G (231) (237).



**Figure 18 – Processus d’assemblage et de maturation des snoRNP à boîtes H/ACA.**

La première étape de l’assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA est l’interaction de SHQ1 avec DKC1 pour empêcher sa dégradation et toute liaison illicite à des ARN non-spécifiques. SHQ1 est ensuite libérée à l’aide du complexe HSP90/R2TP, permettant l’interaction de la DKC1 avec le pré-snoARN H/ACA nouvellement synthétisé. À cette étape, les protéines NHP2 et le NOP10 sont présents dans la pré-particule, ainsi qu’un autre facteur d’assemblage NAF1 qui interagit avec le domaine C-terminal phosphorylé (CTD) de l’ARN polymérase II et maintient le snoRNP à boîte H/ACA inactive. Enfin, le NAF1 est remplacé par la protéine GAR1 pour produire des snoRNP à boîtes H/ACA matures et fonctionnelles. Alors que les scaRNP sont retenues dans les corps de Cajal, les snoRNP à boîtes H/ACA sont transportées dans le nucléole suite à l’intervention de la protéine NOPP140. Les protéines communes aux snoARN à boîtes H/ACA comprennent la dyskérine (pseudouridine synthase), GAR1, NHP2 et NOP10. Source : [Prise de \(237\)](#).

#### iv. La diversité fonctionnelle des snoRNP.

Les snoARN ont reçu beaucoup moins d’attention, mais l’examen de ces espèces s’est rapidement développé au cours des dernières années. Au départ, on pensait que le rôle central des snoARN était limité aux modifications, à la maturation et à la stabilité des ARNr. En effet, ces modifications post-transcriptionnelles

sont importantes pour la production de ribosomes efficaces et précis, telles que l'isomérisation de l'uridine et la méthylation du ribose (217) (220). Cependant, des études récentes montrent que la complexité des deux familles de snoARN guides a été largement sous-estimée. Leur diversité est liée non seulement à leur organisation génétique et à leur biosynthèse, mais aussi à l'existence de variantes de structures de snoARN et de multiples cibles d'ARN cellulaires, reflétant une série de fonctions cellulaires au-delà de la biogenèse des ribosomes.

Aujourd'hui, il est de plus en plus reconnu que des snoRNP canoniques et non-canoniques existent dans les cellules, et donc que les mêmes snoARN pourraient être assemblés en différents complexes protéiques pour des fonctions distinctes. En effet, l'accumulation de preuves suggère que les snoARN ont une grande variété de fonctions non-canoniques, allant de la modulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm, du silençage de l'ARN, de la décondensation de la chromatine à l'efficacité de la traduction. De plus, certains sont même transformés en espèces d'ARN plus courtes (sdARN), par exemple de type miARN ou ARNpi (218) (219) (239). Cette transformation pourrait être d'une importance cruciale, car les miARN jouent un rôle essentiel dans toute une série de processus biologiques. De plus, l'association de certains snoARN à boîtes C/D ou H/ACA à des maladies spécifiques suggère qu'ils pourraient posséder des fonctions cellulaires supplémentaires en plus de diriger la 2'-O-méthylation ou la pseudourylation de l'ARNr. Par exemple, la perte de l'expression de SNORD115 est un facteur décisif dans le syndrome de Prader-Willi, ou encore SNORD60 qui est impliqué dans le trafic intracellulaire du cholestérol (240) (241). De même chez l'humain, un défaut dans le snoARN à boîtes H/ACA de la télomérase, dont le rôle est de maintenir la longueur des télomères par addition de l'ADN télomérique au bout des chromosomes dans les cellules eucaryotes en division, engendre une maladie génétique pléiotropique, la dyskératose congénitale, dont les patients présentent des télomères plus courts, connu comme étant un mécanisme responsable du vieillissement cellulaire (242) (243). Plus précisément, cette maladie héréditaire, variable dans son mode de transmission, est causée par des mutations dans plusieurs gènes (DKC1, NHP2, NOP10, TERT, TERC...). La forme la plus classique, qui est aussi la plus sévère, est la transmission liée au sexe due à des mutations dans le gène codant pour DCK1 (242) (243). Or, cette enzyme est associée non seulement aux snoARN à boîtes H/ACA impliqués dans la pseudouridylation de résidus spécifiques dans l'ARNr, mais également à l'ARN télomérase qui contient un motif consensus H/ACA.

### **Modifications chimiques et maturation des pré-ARNr.**

Les cellules eucaryotes contiennent diverses populations de snoARN métaboliquement stables, présentes dans le nucléole. Leur localisation spécifique implique que ces molécules fonctionnent dans la biogenèse des ribosomes. En effet, des études approfondies menées au cours de ces dernières années ont montré que plusieurs snoARN sont intimement impliqués dans le traitement des pré-ARNr en jouant un rôle essentiel dans la maturation des ARNr et l'assemblage des sous-unités ribosomiques (217) (218) (244). Alors que la

plupart des snoARN guides dirige la modification des nucléotides sur des sites spécifiques dans l'ARNr, quelques-uns orchestrent les événements de clivage des ARNr (217) (218) (244).

Les ribosomes organisés en deux sous-unités ribonucléoprotéiques (RNP) sont des composants cellulaires extrêmement bien conservés qui participent au décodage du code génétique contenu dans l'ARNm et qui catalysent la synthèse des protéines dans tous les organismes. Leur biogenèse dans le noyau est l'un des processus les plus complexes de la cellule, qui implique une série d'étapes de traitement du pré-ARNr. Chez les eucaryotes, ce processus a lieu de manière séquentielle, depuis le nucléole, puis le nucléoplasme, et enfin le cytoplasme. Il implique la transcription et la maturation des pré-ARNr, leur repliement correct et l'assemblage avec les protéines ribosomiques, ainsi que le transport des particules pré-ribosomiques dans le cytoplasme pour les étapes finales de leur maturation (218) (245). De nombreux facteurs intermédiaires (protéines et petits ARN) participent ainsi de manière transitoire aux différentes étapes de maturation.

L'activité correcte des ribosomes nécessite la présence de nucléotides soigneusement modifiés à des positions précises dans la séquence de leurs ARNr (218) (245). Ces modifications sont générées par des enzymes catalysant des réactions de modifications chimiques sur les transcrits. Deux grands types de modifications post-transcriptionnelles dominent : la méthylation de l'hydroxyle en position 2' du ribose (2'-O-méthylation) et la conversion d'uridines en pseudouridines (pseudouridylation) (217) (218) (246). Ces modifications sont fortement concentrées dans des régions fonctionnellement importantes du ribosome, à savoir le centre peptidyl transférase (CPT), le site de décodage et l'interface entre les sous-unités (245) (246). Cette corrélation a donné naissance à l'opinion selon laquelle les modifications jouent un rôle actif dans le processus de traduction. En effet, les modifications post-transcriptionnelles permettent d'améliorer l'aptitude du ribosome à plusieurs niveaux, notamment sur la formation et la stabilité des sous-unités, la vitesse de traduction et la structure des ribosomes (245) (246). La 2'-O-méthylation confère à un nucléotide une plus grande hydrophobicité, protège contre les attaques nucléolytiques et stabilise les hélices, et peut donc bénéficier d'interactions inter- ou intramoléculaires (246). La pseudouridine exerce une influence rigidifiante subtile mais significative sur le squelette sucre-phosphate et améliore l'empilement des bases. En outre, la pseudouridine fournit un site donneur supplémentaire pour la formation de liaisons hydrogènes, qui permettent de stabiliser les interactions ribosome-ARN (246).

Ces deux types de modifications de l'ARNr eucaryote sont dirigés par deux grandes familles de snoARN (snoARN à boîtes C/D et H/ACA) qui spécifient les sites à modifier, dans les deux cas par la formation d'un duplex spécifique au site de modification de l'ARNr, tandis que la fonction catalytique est assurée par une enzyme protéique commune, la méthylase ou pseudouridine synthase, associée à l'ARNr. Les snoRNP à boîtes C/D et H/ACA réalisent ainsi des étapes de modifications de nucléotides, mais aussi de clivages endonucléolytiques et participent à la formation des particules pré-ribosomiques (217) (218). Ainsi, les snoRNP C/D et H/ACA sont des acteurs essentiels de la biogenèse des ribosomes. De plus, les snoARN ciblent principalement l'ARNr

pour modifier des régions fonctionnellement importantes du ribosome, mais d'autres objectifs incluent le traitement endonucléolytique des pré-ARNr, le guidage des snARN, tels que le snARN U6, et plus récemment le guidage de l'ARNm ou la régulation de l'épissage alternatif dans les pré-ARNm (218) (244) (247).

### **Les snoARN peuvent être les précurseurs naturels de petits ARN non-codant fonctionnels régulant l'expression des gènes.**

Jusqu'à présent, les molécules de snoARN, très abondantes et bien structurées, étaient supposées jouer un rôle dans la biogenèse des ribosomes (218) (244). Cependant, des preuves de plus en plus nombreuses montrent clairement que de nombreux snoARN sont transformés en d'autres espèces d'ARN plus courts (<35 nt), désignées collectivement sous le nom d'ARN dérivés de snoARN (sdARN) (225) (226) (227). Une petite partie génère des petits ARN de type miARN, tandis que les autres donnent naissance à des ARN plus longs, comme les petits ARN de type ARNpi (205) (226) (227). En effet, les snoARN à boîtes H/ACA donnent naissance à des ARN de 17 à 19 nt de longueur, alors que les snoARN à boîtes C/D génèrent des fragments de plus de 27 nt (226). De plus, cela pourrait indiquer que les snoARN ont de nouvelles fonctions.

Comme les snoARN canoniques, les sdARN servent probablement d'échafaudage pour former des complexes protéiques et aussi de dispositif de ciblage. Il est probable que les sdARN fonctionnent avec différents mécanismes dans divers aspects de l'expression des gènes : transcription des gènes, traitement des pré-ARNm et éventuellement remodelage de la chromatine (226). Par conséquent, les sdARN pourraient jouer un rôle régulateur important dans l'expression des gènes. Par exemple, les miARN dérivés des snoARN (snoARN-miARN) remplissent les fonctions cytosoliques traditionnelles. Plusieurs snoARN canoniques ont généré des miARN qui ont influencé la traduction (226) (227).

- **Les snoARN-miARN.**

Certains des sdARN présentent des caractéristiques semblables à celles des miARN, comme la dépendance à la transformation par DICER et l'association avec les protéines AGO, composants caractéristiques du complexe de silençage induit par l'ARN (RISC) (226) (227). Effectivement, il existe des preuves qu'une petite fraction de snoARN peut générer des molécules plus petites correspondantes à la taille des miARN, et qui peuvent exercer les effets spécifiques des miARN dans le silençage génétique post-transcriptionnel. Ces nouvelles molécules sont appelées plus précisément des « snoARN-miARN ». Elles ont été identifiées et décrites pour la première fois par le laboratoire de G. MEISTER qui a montré l'existence de petits ARNnc stables issus des snoARN précurseurs suite à une analyse à haut débit des ARN associés aux protéines AGO1 et AGO2 humaines (227). Le premier ARN de ce type identifié et documenté provenait du scaARN ACA45, un sous-type de snoARN à boîtes H/ACA, capable de réguler l'ARNm codant pour une sous-unité protéique du médiateur CDC2L6 (227). En effet, le scaARN ACA45 est transcrit et fonctionne dans le nucléole des cellules humaines.



Cependant, une petite partie est transportée vers le cytoplasme par un récepteur nucléaire d'export jusqu'ici inconnu, où le snoARN complet subit immédiatement une transformation en snoARN-miARN ACA45 de 22 – 23 nt, semblable à un miARN (227). Il a été montré que cette maturation était, dans ce cas, indépendante de la RNase de type III DROSHA, mais nécessitait l'action de la RNase de type III DICER, toutes deux impliquées dans la maturation classique des miARN (227). Ainsi, cela suggère un rôle fonctionnel pour les produits issus de la maturation du scaARN ACA45 en lien avec le silençage post-transcriptionnel des gènes et dont le mécanisme d'action est similaire à celui des miARN. A ce jour, d'autres snoARN-miARN, ou tout simplement d'autres sdARN, ont été identifiés ou prédits (226). Ainsi, il est possible que même les snoARN considérés comme canoniques forment des RNP supplémentaires. Certains snoARN peuvent donc présenter à la fois les caractéristiques et les fonctions des snoARN classiques, et peuvent générer des snoARN-miARN fonctionnels semblables aux miARN (226).

- **Les snoARN-ARNpi.**

D'autres sdARN sont de taille plus longue et forment des RNP nucléaires hétérogènes (RNPnh) avec des effets sur l'expression des gènes (226). Certains snoARN peuvent donner naissance à des ARNpi (« snoARN-ARNpi »), une autre classe de petits ARNnc impliqués dans la régulation épigénétique (205) (238). Les ARNpi sont des ARN régulateurs spécifiquement exprimés dans les cellules germinales, mais aussi largement dans les cellules somatiques (203). Dans la plupart des cas, les ARNpi jouent des rôles dans la suppression de l'expression des rétro-transposons afin d'augmenter la stabilité du génome (203). Néanmoins, il a été montré que les ARNpi sont aussi impliqués dans la méthylation des histones et de l'ADN, et dans la régulation de l'expression des gènes à la fois dans les cellules somatiques et germinales (205).

Récemment, il a été montré qu'une grande quantité d'ARNpi dérivés de snoARN à boîtes C/D, le sdARN piR30840, a été identifié dans les lymphocytes T CD4 primaires humains, qui sont un groupe de cellules somatiques hautement différenciées (205). L'ARNpi piR30840 dans les lymphocytes T CD4 humains a été retrouvé associé aux protéines PIWI4 et AGO4, et cette association est spécifique des cellules T CD4 humaines (205). Ces données suggèrent un rôle spécifique de cette classe d'ARNnc dans les lymphocytes humains : le snoARN-ARNpi piR30840 régule les taux d'ARNm de l'IL-4 par une augmentation de sa dégradation par l'exosome nucléaire via son interaction avec le complexe de polyadénylation Trf4-Air2-Mtr4 (TRAMP) par un mécanisme de complémentarité des séquences entre l'ARNpi et une région intronique de l'ARNm de IL-4 (205). En outre, cette réaction inhibe aussi la différenciation des cellules Th2, un sous-type de lymphocytes T CD4 naïfs (205). Ainsi, ces résultats dévoilent un nouveau mécanisme moléculaire pour l'ARNpi et peut-être une voie importante et universelle pour la régulation épigénétique, qui va au-delà de celui observé dans les lignées germinales ou d'autres cellules somatiques.

## **Caractérisation des snoRNP associés à la chromatine.**

En plus du rôle bien caractérisé des snoARN dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr des archées aux eucaryotes, une étude a montré que des snoARN spécifiques contrôlent le compactage de la chromatine et son accessibilité dans les cellules de drosophile (248). Ils ont identifié un mécanisme dépendant de l'ARN qui maintient la structure de la chromatine accessible et active dans les régions euchromatiques dans les cellules de drosophile (225) (248) (249). Ce mécanisme réversible d'ouverture et d'accessibilité de la chromatine, reconstitué *in vitro*, dépend du facteur de décondensation DF31 qui se lie spécifiquement à l'ARN et se localise dans les régions euchromatiques (248). DF31 est capable d'attacher à la chromatine une sous-classe hétérogène de petits ARN simple brin (248). Cette classe d'ARN nommée caARN (ARN associé à la chromatine) est liée de manière stable à la chromatine et est en grande partie composée de snoARN, qui sont préférentiellement liés par DF31. Cette liaison des snoARN à la chromatine, médiée par DF31, conduit à la formation d'un réseau RNP-chromatine qui interfère avec le repliement ordonné des structures d'ordre supérieur et établit ainsi une configuration de la chromatine accessible à la transcription. En effet lorsque le caARN est éliminé, la liaison de DF31 est réduite ce qui entraîne un compactage de la chromatine et des domaines euchromatiques inaccessibles à la transcription. Cependant, cette structure peut être à nouveau décondensée par l'ajout de snoARN. De plus, l'analyse de caARN dans les cellules humaines a aussi révélé un fort enrichissement en snoARN à ce niveau, ce qui implique un rôle conservé pour ces molécules dans le maintien de structures chromatiniennes d'ordre supérieur ouvertes, permettant ainsi des processus dépendants de l'ADN tels que la transcription et la réplication (248). Ces résultats suggèrent qu'une sous-population de snoARN est associée de manière stable à la chromatine dans différents organismes et régule l'accessibilité des régions génomiques, mais aussi qu'il est possible que ces snoARN forment de nouveaux complexes RNP distincts contenant des protéines spécifiques à la chromatine, en remplacement des protéines des snoARN classiques (248) (249).

## **Contrôle du taux de production d'ARNm cellulaires.**

Chez les eucaryotes, la plupart des pré-ARNm nécessitent un traitement profond pendant leur maturation. Une étape essentielle est la maturation de l'extrémité 3', aussi appelée polyadénylation, qui comprend le clivage endonucléolytique dans la partie 3' terminale du pré-ARNm et l'ajout d'une queue poly(A). Ce processus requiert une machinerie spécifique composée d'un certain nombre de facteurs multi-protéiques, comme le complexe CPSF (Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor) qui se fixe au signal AAUAAA et réalise le clivage du pré-ARNm à l'endroit où démarre la polyadénylation.

Une étude a montré qu'un sous-ensemble de snoARN s'associe physiquement et spécifiquement à FIP1, une sous-unité du complexe CPSF. Par exemple, le snoARN à boîtes C/D SNORD50A riche en U/A inhibe la maturation de l'ARNm en 3' en bloquant l'interaction de FIP1 avec les séquences du site de polyadénylation (PAS) (250). En effet, un excès de SNORD50A inhibe le traitement de l'ARNm en 3' alors que son épuisement

entraîne une augmentation de l'efficacité du processus de polyadénylation et des niveaux de transcrits plus élevés d'un sous-ensemble de gènes (250). Ainsi, ces données ont montré que les snoARN interagissant avec le complexe CPSF servent principalement de régulateurs négatifs et ont aussi révélé une nouvelle fonction des snoARN dans la régulation du processus de maturation de l'extrémité 3', et donc dans l'expression des gènes.

### **Les snoARN dans la régulation de l'épissage alternatif.**

Récemment, il a été découvert qu'un groupe de snoARN à boîtes C/D dans le cerveau ne présentent aucune complémentarité de séquence claire avec d'autres ARN non-messager, ce qui suggère que les snoARN à boîtes C/D pourraient avoir des fonctions autres que la 2'-O-méthylation (240) (251). L'un de ces snoARN à boîtes C/D "orphelins" est le HBII-52 (SNORD115). Il est exprimé à partir du locus SNURF-SNRPN sur le chromosome 15q11-13 (ou 7C chez la souris) (240) (251). Le locus est soumis à l'empreinte génomique parentale et certains gènes ne sont exprimés qu'à partir de l'allèle paternel (240) (251). La grande région 3'-UTR du locus SNURF-SNRP abrite des groupes de snoARN à boîtes C/D HBII-85 (SNORD116) et HBII-52 (SNORD115), conservés au cours de l'évolution, qui sont présents en 24 et 47 répétitions, respectivement (240) (251). L'expression de ces snoARN est spécifique aux tissus. En outre, la région abrite des copies uniques d'autres snoARN à boîtes C/D : HBII-13, HBII-436, HBII-437, HBII-438A et HBII-438B, et qui sont exprimés dans des tissus non cérébraux (240) (251). Chez l'homme, la perte d'expression des gènes de la région q11-13 du chromosome 15 hérité du père est une cause décisive du syndrome de Prader-Willi, une maladie génétique rare entraînant des troubles du développement et du comportement (240) (251). Le snoARN SNORD115 contient un élément anti-sens conservé de 18 nt, complémentaire à l'exon Vb du pré-ARNm spécifique du cerveau codant pour le récepteur de la sérotonine 2c (5-HT2CR) (240) (251). Une étude a indiqué que le snoARN SNORD115 est impliqué dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm codant le récepteur 5-HT2CR, ce qui est différent de la fonction traditionnelle du snoARN à boîtes C/D dans la méthylation des ARNr (225) (240) (251). En effet, en présence du snoARN SNORD115, l'ARN mature produit contiendrait l'exon Vb en entier, conduisant à la forme fonctionnelle du récepteur à la sérotonine (240) (251). En revanche, en son absence, un site proximal d'épissage au niveau de l'exon Vb serait utilisé, conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon VI (240) (251). Enfin, il a été signalé qu'une augmentation de l'expression des snoARN à boîtes C/D à partir de la région 15q11-q13 conduit à des phénotypes autistiques chez les souris, ce qui suggère en outre que les snoARN jouent un rôle important dans la régulation des gènes (240) (251). Outre 5-HT2CR, il a été démontré que le snoARN à boîtes C/D MBII-52, l'homologue murin d'HBII-52, affecte aussi les profils d'épissage des pré-ARNm d'au moins cinq autres gènes (DPM2, TAF1, RALGPS1, PBRM1 et CRHR1) (251). De plus, une autre étude a montré que l'expression de MBII-52 a conduit à sa transformation en fragments plus petits (sdARN) (251). Ainsi, la principale forme d'ARN fonctionnelle du groupe MBII-52 n'est pas le snoARN canonique à boîtes C/D, mais serait la forme d'ARN plus courte et qui serait impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif (251). De plus, l'étude a montré que le snoARN à boîtes C/D MBII-52 classique est exprimé à de faibles niveaux dans les

cellules, alors que les sdARN présentent une expression et une accumulation plus élevées (251). Ces sdARN sont plutôt associés aux RNPnh et pourraient avoir de multiples fonctions en ciblant ces protéines vers d'autres ARN. En effet, il a été démontré que la Fibrillarine était absente d'un grand nombre de fractions contenant le SNORD115, ce qui soutient fortement l'existence de nouveaux complexes ARN-protéines distincts des snoRNP canoniques (251) (252). L'analyse sur la composition protéique a révélé que l'ARN peut s'associer à des protéines non-canoniques impliquées dans différentes voies, telles que dans la sélection du site d'épissage (RNPnh A1, A2, TDP-43 et D0), dans la régulation post-transcriptionnelle (ELAVL1/HuR) et dans l'organisation de la chromatine (Nucléoline) (251) (252). Ainsi, le snoARN SNORD115 forme à la fois un complexe canonique contenant de la Fibrillarine et de nouveaux complexes RNPnh, ayant un rôle dans la régulation de l'épissage ou dans la traduction.

Des observations similaires ont été faites pour d'autres snoARN. Dans une autre étude, le snoARN à boîtes C/D HBII-180C (SNORD88C) a été analysé, révélant la présence d'une complémentarité des séquences avec plusieurs pré-ARNm, dont FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) (225) (253). Outre les boîtes conservées caractéristiques, SNORD88C héberge également une région de complémentarité en aval de la boîte D' avec les séquences endogènes de pré-ARNm, appelée la boîte M (253). Les analyses fonctionnelles ont démontré que le snoARN SNORD88C peut affecter l'épissage alternatif du pré-ARNm de FGFR3, en plus de son rôle de guidage dans la modification post-transcriptionnelle de l'ARNr 28S. En effet, la surexpression de SNORD88C de type sauvage dans des cellules HeLa a réduit le niveau d'expression de l'isoforme épissé de FGFR3 (253). Par contre, la surexpression du snoARN muté au niveau de la boîte D ne reproduit pas le même effet (253). De nouveau, ces données soutiennent le rôle de certains snoARN dans la régulation de l'épissage. De plus, il a été montré que le snoARN SNORD88C peut également générer des fragments d'ARN stables plus courts (sdARN) (253).

Une autre étude récente réalisée chez l'humain a montré qu'un sous-ensemble de snoARN à boîtes C/D n'est pas associé à la Fibrillarine, ce qui indique qu'une fraction de ces snoARN s'assemble dans des complexes protéiques différents des snoRNP canoniques (247). Le snoARN à boîtes C/D, SNORD27, dirige la 2'-O-méthylation de l'adénosine 27 dans l'ARNr 28S. Dans cette étude, SNORD27 est proposé réguler l'épissage alternatif du pré-ARNm du facteur de transcription E2F7, et cette fonction se réalise par interaction directe ARN-ARN sans la méthylation de l'ARN, probablement en rentrant en compétition avec la snRNP U1 spliceosomale (225) (247). En outre, l'élimination de SNORD27 active des exons auparavant « silencieux » dans plusieurs autres gènes (*MAP4K3*, *ZBTB37*, *FER* et *ABCA8*) grâce à la complémentarité de bases située dans la séquence entière de SNORD27 et pas seulement dans les boîtes anti-sens (247). Ainsi, certains snoARN à boîtes C/D peuvent intervenir à la fois dans le traitement des pré-ARNr et dans celui des pré-ARNm, ce qui augmente le répertoire des facteurs régulateurs d'épissage.

## Les lncARN liés aux snoARN.

En plus des sdARN décrits dans la section ci-dessus, des lncARN dont les extrémités correspondent à des séquences de snoARN à boîtes C/D ou à boîtes H/ACA ont été découvertes et identifiées sous le terme de lncARN liés aux snoARN (snoARN-lncARN) (228). Cette nouvelle classe d'ARN, dérivée d'introns et dépourvue d'une coiffe 5' et d'une queue poly(A) en 3', est traitée aux deux extrémités par le mécanisme de biogenèse des snoARN (228). Au cours du clivage exonucléolytique, les séquences entre les snoARN n'ont pas été dégradées, ce qui entraîne l'accumulation de lncARN flanqués par des séquences de snoARN (228). De plus, ces snoARN-lncARN sont retenus dans le noyau, s'accumulant près de leur site de transformation, mais pas dans le nucléole ou les corps de Cajal (228). La plupart de ces snoARN-lncARN sont liés à un site génomique, la région à empreinte parentale 15q11-q13, responsable du syndrome de Prader-Willi (228). En effet, ils ne sont pas localisés dans les nucléoles ou les corps de Cajal, mais s'accumulent bien près de leur site de synthèse. Certains d'entre eux interagissent avec les facteurs d'épissage de la famille FOX, modulant ainsi de manière subtile certains aspects de l'épissage des ARN (228). De plus, il est montré que le KO des snoARN-lncARN dans la région du syndrome de Prader-Willi affecte significativement les niveaux d'expression de certains gènes, tels que *BIRC6* connu pour jouer un rôle crucial dans la division cellulaire (228). Ainsi, ces résultats montrent que les snoARN-lncARN sont impliqués dans la régulation des gènes et la pathogenèse.

### **4. Modifications des principaux systèmes physiologiques associées au vieillissement.**

D'une façon générale, le vieillissement s'accompagne d'une diminution des capacités fonctionnelles de l'organisme. La manière dont fonctionne un organe dépend de la manière dont les cellules qui le composent fonctionnent. Or, les cellules vieillissantes fonctionnent moins bien. De plus, dans certains organes, les cellules meurent et ne sont pas remplacées, donc le nombre de cellules diminue. Ainsi, cette altération dans le fonctionnement normal de l'individu est due à ces diverses modifications liées à l'âge qui se produisent dans les cellules et dans les organes entiers, en dehors de toute pathologie.

Au fil des années, la mouche *D. melanogaster* est apparue comme un puissant système modèle pour définir les interventions génétiques et pharmacologiques favorisant la longévité et le vieillissement en bonne santé. La manipulation de l'expression génétique spécifique aux tissus a permis d'identifier certaines des voies de signalisation conservées au cours l'évolution qui jouent un rôle dans l'allongement de la durée de vie et l'amélioration du vieillissement. Notamment, les tissus adipeux et neuronaux semblent être particulièrement importants. En effet, la surexpression de *dFOXO* dans le corps gras des mouches peut prolonger la durée de vie (145). De plus, l'ablation des cellules neurosécrétoires qui sécrètent les Dilp dans le cerveau des mouches permet également de prolonger la durée de vie (142). Des études récentes ont également identifié le tissu

intestinal comme un élément essentiel du vieillissement (147) (180), et se sont principalement concentrées sur la pathologie intestinale hyperplasique résultant de la surprolifération des CSI en fonction de l'âge comme un déterminant majeur de la durée de vie (180).

## **4.1. L'intestin de la drosophile.**

Récemment, l'intestin de la drosophile est passé au premier plan de multiples domaines de recherche. Il est notamment reconnu comme un modèle de choix dans l'étude du vieillissement. Effectivement, l'intestin est un organe clé important dans lequel les modifications génétiques peuvent réguler la durée de vie de l'organisme. En particulier, la réduction de la voie IIS (146), la signalisation mTOR (151), ou l'activation de l'AMPK et l'amélioration associée de l'autophagie (156) sont suffisantes pour prolonger la durée de vie de la drosophile. L'intestin est un organe homéostatique important qui doit à la fois faciliter la digestion et l'absorption et fournir un environnement favorable aux microbes qui facilitent la digestion, tout en agissant comme une barrière en première ligne de défense contre les toxines et les agents pathogènes ingérés (254). L'intestin est également l'un des rares sites chez la drosophile à abriter une série de cellules souches actives, ce qui en fait un tissu intéressant pour la compréhension du rôle, conservé au cours de l'évolution, de la division des cellules souches en tant qu'acteur clé du vieillissement (3). Enfin, l'intestin est aussi un organe endocrinien important, en étant le site de production de nombreux peptides de signalisation impliqués dans l'homéostasie métabolique (254). Ainsi, il existe de nombreuses raisons pour lesquelles le maintien d'une fonction intestinale saine peut servir à améliorer la condition physique, alors qu'un dysfonctionnement peut avoir de profondes conséquences sur la santé de l'organisme. Il est tout à fait possible que le maintien prolongé de la fonction intestinale puisse améliorer la durée de vie de l'organisme, soit directement en renforçant sa fonction digestive et sa fonction de barrière, soit indirectement par son rôle dans la régulation de l'homéostasie métabolique systémique (180).

### **4.1.1. Description anatomique du tube digestif.**

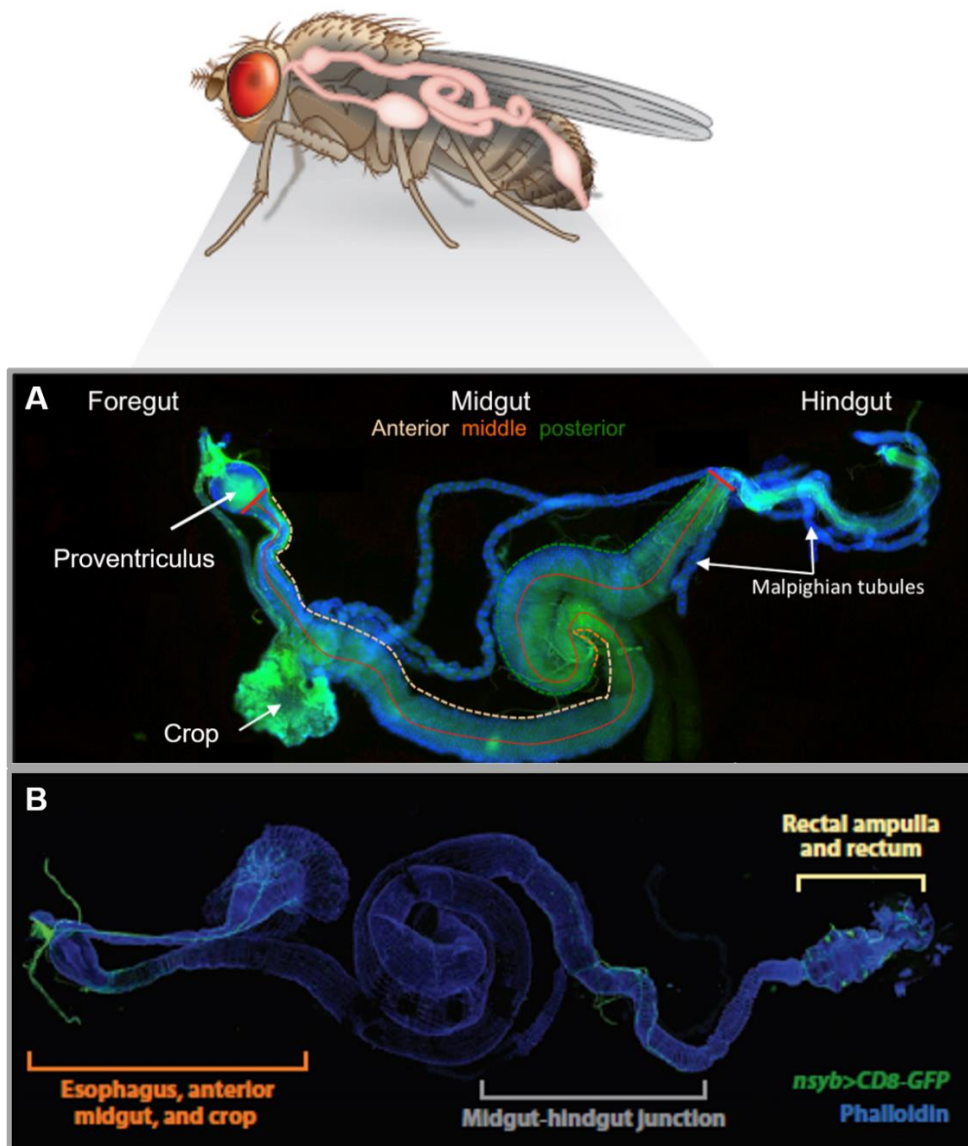
Tant dans sa structure que dans sa fonction, l'intestin de la drosophile présente de nombreuses similitudes avec le tube digestif des mammifères (255). Il est notamment constitué d'un simple épithélium, entouré de muscles viscéraux, de nerfs et de trachées, comme chez les autres insectes (254). Cependant, il existe des variations substantielles de ce thème commun, à la fois au niveau de l'anatomie macroscopique et au niveau cellulaire. Ceux-ci sont principalement déterminés par l'origine du développement d'une région intestinale donnée, ainsi que par son emplacement spécifique le long de l'axe antéro-postérieur. Par exemple, l'épithélium digestif de la drosophile se subdivise en intestin antérieur, moyen et postérieur (Fig. 23) (254). L'épithélium de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur est d'origine ectodermique et sont isolés de l'environnement ex-

terne sur le côté apical par une cuticule imperméable (254). En revanche, l'épithélium de l'intestin moyen d'origine endodermique est protégé du côté luminal par la matrice péritrophique, une sorte de membrane constituée de chitine et de glycoprotéines (254).

L'intestin antérieur comprend l'œsophage, le proventricule (également connu sous le nom de cardia) et le jabot (Fig. 23A). Le jabot est une structure diverticulée propre aux diptères, constituée d'un ensemble complexe de valves et de sphincters assurant le transit du contenu intestinal dans et hors du jabot vers le canal alimentaire principal. Historiquement, il est utilisé pour stocker temporairement les aliments en excès (254) (256). Cependant, des travaux sur d'autres insectes suggèrent qu'il pourrait également fonctionner dans la digestion précoce des aliments ingérés sous l'action des enzymes digestives des glandes salivaires, ainsi que dans leur détoxification par la sécrétion d'anti-microbiens des glandes labellaires, des fonctions qui restent encore à étudier chez la drosophile (257). Le proventricule, situé à la jonction entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen, est un organe complexe en forme de bulbe séparé en deux parties : le proventricule ectodermique et une partie endodermique qui constitue la partie la plus antérieure de l'intestin moyen. Elle fonctionne comme une valve pour réguler le passage des aliments vers l'intestin moyen (254) (256). C'est également le site de production de la matrice péritrophique, et est un site majeur de la production de peptide antimicrobien (254) (256). Postérieurement au cardia, l'intestin moyen, d'une longueur moyenne de 6 mm chez les mouches adultes, occupe une grande partie de l'abdomen et est généralement considéré comme le principal site de digestion et d'absorption des nutriments. Anatomiquement, l'intestin moyen adulte est défini par deux points de repère : le proventricule et le pylore (une deuxième structure en forme de valve) (Fig. 23A) (254) (256). Les tubules de Malpighi, analogues fonctionnels des structures rénales des vertébrés, relient l'intestin à la jonction intestin moyen - intestin postérieur. Elles absorbent les solutés, l'eau ainsi que les déchets de l'hémolymphe environnante pour les recycler en composés solides azotés (Fig. 23A) (254) (256). Ces déchets sont ensuite rejetés dans l'intestin postérieur. En effet, l'intestin postérieur constitue le principal site de réabsorption de l'eau et des électrolytes en concentrant les excréments avant leur élimination. Il est composé du pylore, de l'iléon et du rectum, qui marque la fin du système digestif (Fig. 23A) (254) (256).

Comme mentionné précédemment, l'épithélium de l'intestin moyen est entouré de deux couches de muscle viscéral d'origine mésodermique : une couche externe de 21 bandes musculaires longitudinales et une couche interne de muscle circulaire qui forme quatre rangées distinctes (Fig. 23B) (258). La fonction du muscle viscéral est double ; il assure la médiation du péristaltisme intestinal et constitue une source importante de ligands de la voie de signalisation qui régulent la prolifération des CSI (256). La physiologie de l'intestin est régulée par des hormones et l'innervation entérique et efférentes émanant du système nerveux stomatogastrique du *corpus cardiacum*, une structure neurosécrétoire, et du système nerveux central (SNC), qui prolongent leurs axones vers trois sections du tube digestif (254) (259). Contrairement au système nerveux entérique des mammifères, qui occupe toute la longueur du tube gastro-intestinal, l'innervation du tube digestif adulte de la mouche se limite à trois portions distinctes le long du tube digestif : l'œsophage-jabot-intestin antérieur, la jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur (pylore) et l'ampoule rectale (Fig. 23B) (259). La présence

de fibres nerveuses entre les muscles longitudinaux et les muscles circulaires dans ces trois segments contenant des valves ou sphincters permettent une modulation du transit intestinal par le contrôle neuronal de la fonction des muscles lisses (péristaltisme) (259). Cependant, un sous-ensemble de fibres qui, analogues aux fibres sous-muqueuses de mammifères, se projette à travers les muscles circulaires contigus vers la couche épithéliale sous-jacente. Cette organisation permet notamment une régulation neuronale des propriétés épithéliales, telles que la sécrétion et l'absorption (259). En outre, l'intestin est influencé par le système trachéal, un réseau de tubules entourant l'intestin pendant le développement et délivrant de l'oxygène aux cellules de l'intestin s'apparentant aux vaisseaux sanguins des mammifères (Fig. 26) (256). Des travaux ont montré qu'il peut influencer la régénération épithéliale chez l'adulte (254).



**Figure 23 – Schéma du système digestif adulte de la drosophile.**

(A) Représentation d'un intestin de drosophile adulte disséqué et marqué au DAPI (bleu). Le tube digestif est divisé en trois domaines distincts de morphologies, de fonctions et d'origines développementales différentes : l'intestin antérieur, moyen et postérieur. L'intestin antérieur est composé de l'œsophage, du proventricule (cardia) et du jabot. L'intestin moyen commence avec le proventricule et se termine au niveau de la valve pylorique. Il est considéré comme le principal site de



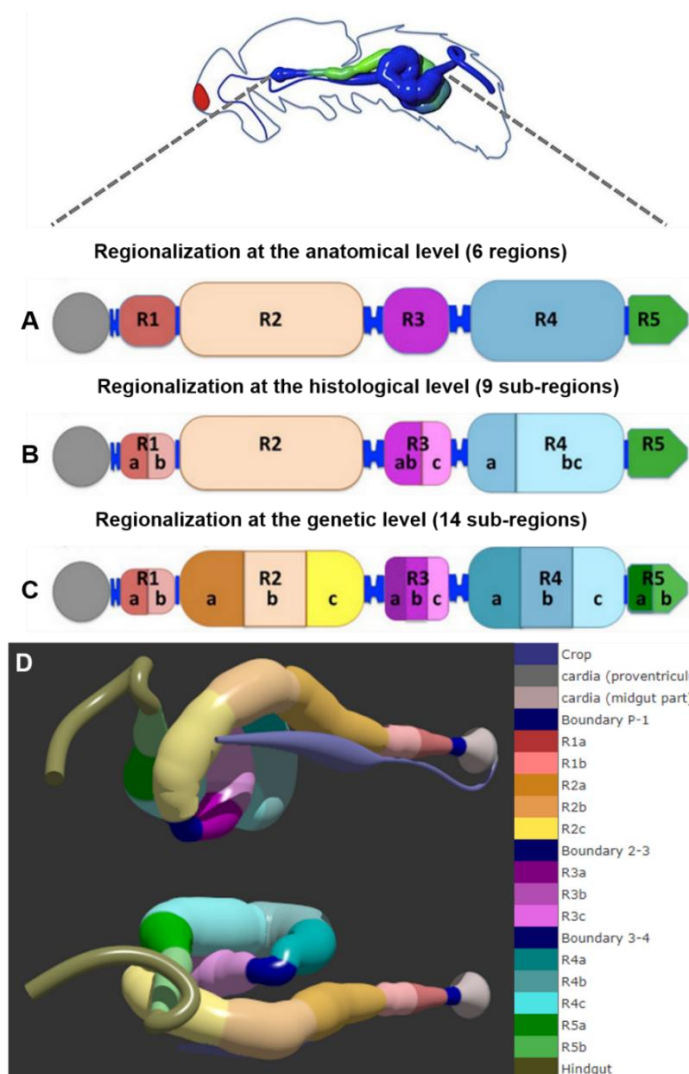
digestion et d'absorption des nutriments. Au niveau du pylore se ramifient les tubules de Malpighi, des homologues fonctionnels des reins chez les mammifères, qui longent l'intestin moyen et entrent en contact avec l'intestin ensemble avec le jabot au niveau de la jonction thorax-abdomen. Enfin, le tube digestif se termine par l'intestin postérieur constitué du pylore, de l'iléon et de l'ampoule rectale, qui permet le relargage des déchets à l'extérieur. **Vert** : autofluorescence. **(B)** Visualisation de l'innervation d'un tube digestif disséqué d'une mouche adulte exprimant le rapporteur *UAS-CDB-GFP* sous le contrôle de la lignée « driver » pan-neuronale *nsyb-GAL4* (**vert**). L'intestin est contre-coloré avec de la phalloïdine (**bleu**) pour mettre en évidence les muscles viscéraux. Le tube digestif de la mouche est innervé par des neurones efférents et sensoriels au niveau de l'œsophage-jabot-intestin antérieur, de la valve pylorique et de l'ampoule rectale. Source : Prise de (254) et (260).

#### 4.1.2. Régionalisation fonctionnelle de l'intestin moyen.

En partie à cause des origines hétérogènes et de la complexité de son développement, l'intestin adulte est un organe régionalisé, et certaines de ses parties peuvent subir un remodelage frappant tout au long de la vie adulte (256). Les régions ectodermiques de l'épithélium intestinal sont relativement mal comprises par rapport à l'intestin moyen, qui a bien été caractérisé ces dernières années. Dans cette section, nous mettrons ainsi l'accent sur l'intestin moyen : le principal site de digestion et d'absorption. Le maintien d'une structure intestinale compartimentée est une caractéristique vitale pour l'organisme car elle optimise la digestion en permettant des fonctions séquentielles allant de l'ingestion et du traitement des aliments, à l'absorption des nutriments et à l'élimination des déchets en plus de la compartimentation des fonctions immunitaires et homéostatiques (260) (261).

Traditionnellement, l'intestin moyen adulte est subdivisé en trois segments : l'intestin moyen antérieur, intermédiaire et postérieur (Fig. 23A) (254) (256). Cette régionalisation a été établie suite à la présence d'un ensemble de cellules hautement différenciées, les cellules de cuivre (« Copper cells » en anglais), dans l'intestin moyen intermédiaire, qui sont fonctionnellement apparentées aux cellules pariétales gastriques des vertébrés car elles sécrètent toutes deux de l'acide (262). Or, une récente étude a révélé que l'intestin moyen est beaucoup plus organisé au niveau de la morphologie cellulaire, du comportement cellulaire et de l'expression génique qu'un simple tube cellulaire uniforme contenant une région centrale acide. En effet, il a été démontré que l'intestin moyen est en fait composé de six grandes régions qui ont été nommées R0 - R5 (dont R0 correspond au cardia), séparées par des frontières anatomiques distinctes identifiées comme des rétrécissements du rayon de l'intestin (Fig. 24A) (260) (261). De plus, certaines d'entre elles sont entourées par des ensembles de muscles anatomiquement distincts, agissant comme des sphincters pour réguler le transit alimentaire (260) (261). La première frontière, B<sub>R0</sub> - B<sub>R1</sub>, sépare la partie endodermique du cardia (nommée R0) de la partie antérieure de l'intestin moyen (Fig. 24A) (260) (261). La R1 est une région située dans le thorax et se termine à une position qui correspond à un centre anatomique où l'intestin moyen, le jabot et les tubules de Malpighi interagissent physiquement. Ce « nœud » anatomique particulier à la frontière entre le thorax et l'abdomen correspond à la seconde frontière séparant la R1 de la R2 (B<sub>R1</sub> - B<sub>R2</sub>) (260) (261). La R2 correspond à une partie

abdominale de l'intestin moyen qui est située dorsalement et qui retombe ventralement dans la partie postérieure (Fig. 24D) (260) (261). Les régions R1 et R2 correspondent à l'intestin moyen antérieur décrit précédemment (Fig. 23A). Les deux plus grandes limites anatomiques,  $B_{R2} - B_{R3}$  et  $B_{R3} - B_{R4}$ , délimitent le compartiment R3 qui correspond à la région abritant les cellules de cuivre (« Copper cells ») de l'intestin moyen. De plus, ces deux sites de constriction correspondent aux points d'inflexion où l'intestin moyen se plie de manière stéréotypée à l'intérieur de la cavité corporelle et se retourne brusquement (Fig. 24D) (260) (261). La R4 forme une boucle qui réoriente l'intestin moyen vers la partie postérieure de l'abdomen (Fig. 24D). Enfin, la frontière  $B_{R4} - B_{R5}$  précède la région R5, un segment ascendant de l'intestin moyen qui rejoint l'intestin postérieur (Fig. 24D) (260) (261). Les régions R4 et R5 forment l'intestin moyen postérieur précédemment caractérisé (Fig. 23A) (260) (261).



**Figure 24 – Aperçu des régions de l'intestin moyen.**

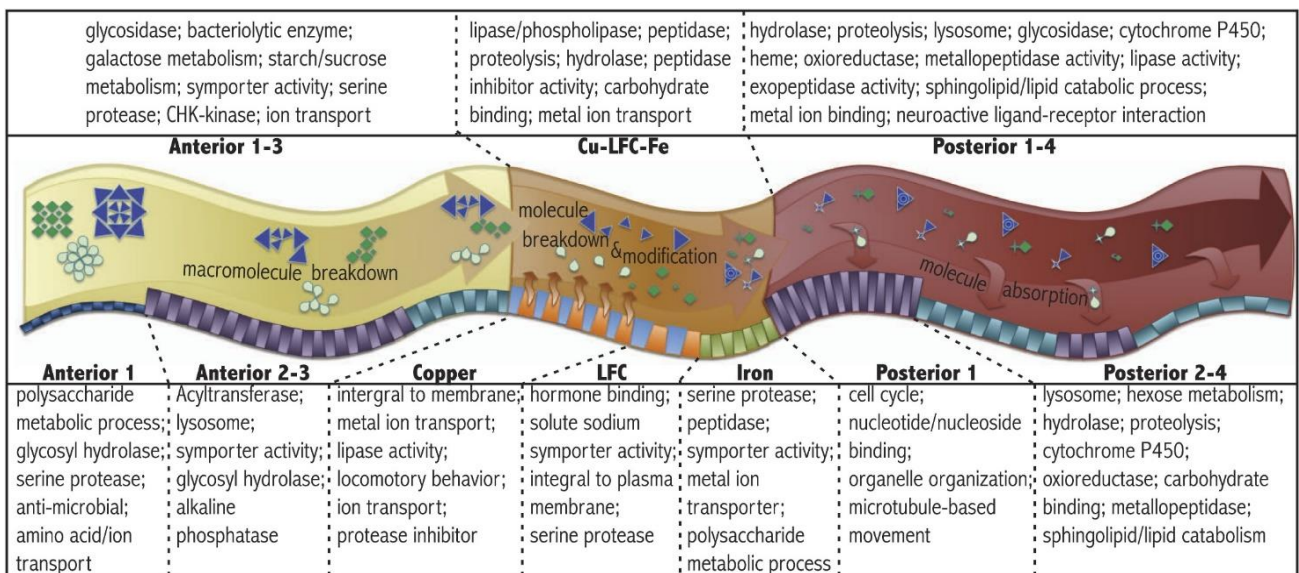
**(A - C)** Une carte en 2D des régions de l'intestin moyen de drosophile. **(A)** Une analyse morphométrique a permis de définir six principales régions au sein de l'intestin moyen, qui ont été nommées R0 – R5 (dont R0 correspond au cardia). **(B)** Une analyse histologique a permis l'identification de sous-régions supplémentaires : R0, R1a & R1b, R2, R3ab & R3c, R4a & R4bc, et R5. **(C)** Une analyse du profil d'expression génique comprenant ceux de 92 transgènes rapporteurs exprimés

dans les EC a permis l'identification de nouvelles sous-régions dans l'intestin moyen. **(D)** Des représentations tridimensionnelles latérales et ventrales de l'intestin moyen adulte de drosophile. Cette reconstruction en 3D met en évidence les points d'inflexion de l'intestin moyen dans l'abdomen. Les sous-régions intestinales sont colorées comme indiqué dans la légende et les frontières anatomiques sont représentées en **bleu**. Source : Prise de <https://flygut.epfl.ch/overview>.

Cependant, des analyses génétiques et histologiques détaillées ont révélé une régionalisation plus poussée de ces régions de l'intestin moyen. Ces cinq grandes régions (R1 – R5) sont elles-mêmes morphologiquement et moléculairement subdivisées en huit à treize sous-régions (Fig. 24B et C) (260) (261). Chaque région de l'intestin moyen est caractérisée par des caractéristiques histologiques et cellulaires spécifiques (largeur de la lumière, taille et la forme des cellules, etc...), des taux de prolifération des CSI, des propriétés physiques (par exemple, le pH luminal) et des profils d'expression génique (260) (261). L'analyse histologique a révélé que trois régions pouvaient être divisées en sous-régions en fonction des différences observées dans la structure des EC. En effet, la R1 peut être divisée en deux sous-régions : la R1a composée de cellules aplaties, et la R1b composée de gros EC qui restreignent considérablement la taille de la lumière (260) (261). De même, la R3 peut être subdivisée en une section antérieure contenant les cellules de cuivre (« Copper cells ») (R3ab) et une section postérieure (R3c) avec de larges cellules aplaties (LFC) (260) (261). Enfin, la R4 peut être subdivisée en une partie antérieure (R4a), caractérisée par un épithélium extrêmement replié où les EC contiennent des gouttelettes lipidiques, et une partie postérieure (R4bc) composée de courtes cellules entraînant une hypertrophie de la lumière intestinale (260) (261).

Par la suite, une analyse transcriptomique a été effectuée afin de caractériser les différences d'expression génique entre les cinq principales régions de l'intestin moyen. Cette étude indique une spécialisation fonctionnelle des différentes régions intestinales. En effet, il a été démontré que les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation des macromolécules complexes sont enrichis dans la partie antérieure de l'intestin, alors que les segments postérieurs sont principalement consacrés à l'absorption des micronutriments (Fig. 25) (260) (261). Plus en détails, les aliments qui entrent dans l'intestin moyen antérieur à partir du proventricule commencent à se décomposer en raison de l'action des enzymes exprimées dans l'intestin moyen antérieur (Fig. 25) (260) (261). En plus des enzymes digestives, les EC antérieurs peuvent sécréter d'autres substances, telles que des lipides pour aider à la solubilisation des nutriments (260) (261). Il a été montré que la dégradation des protéines par les sérine-peptidases a lieu principalement dans les régions R2, mais aussi R4 et R5 (Fig. 25) (260) (261). De même, les transcrits codant pour les enzymes impliquées dans la transformation des glucides complexes, tels que le glycogène ou l'amidon, sont enrichis dans la R2, tandis que ceux impliqués dans la transformation des glucides simples se trouvent principalement dans la R4 (260) (261). Il a également été constaté que les gènes associés au métabolisme des vitamines sont enrichis dans la partie antérieure de l'intestin, plus particulièrement dans le jabot et la région cardia/R1 (260) (261). Dans la R3, les aliments sont davantage digérés libérant des sucres, des AA, des AG, etc.... (Fig. 25) (260) (261) Cette région héberge aussi des transcrits codant pour les transporteurs de métaux. En effet, les ions métalliques qui doivent être réduits

avant de pouvoir être absorbés y sont absorbés pour le stockage ou le métabolisme. Par exemple, la R3c est dédiée à l'absorption du fer (Fig. 25) (260) (261). Enfin, à leur entrée dans l'intestin moyen postérieur, les micronutriments commencent à être massivement absorbés par les EC et transportés vers d'autres régions du corps pour y être stockés, modifiés ou utilisés (Fig. 25) (260) (261). Un rôle clé de la R4 dans le traitement de classes spécifiques de lipides, telles que les sphingolipides et le cholestérol, a été souligné avec notamment la présence particulière de gènes codant pour les lipases, les céramidases et les enzymes impliquées dans le métabolisme des stérols dans cette région (260) (261). Cet important flux de nutriments dans la région postérieure peut expliquer le taux de prolifération élevé des CSI par rapport aux autres régions (263) (264). Concernant les défenses immunitaires, l'analyse génétique a montré que le système immunitaire de l'intestin est compartimenté entre les parties endodermiques et ectodermiques du tube digestif. En effet, l'activité anti-bactérienne est importante dans la région cardia/R1, ce qui suggère qu'un cocktail de peptides anti-microbiens est opérationnel à l'entrée de l'intestin pour protéger l'hôte des bactéries pathogènes (260) (261). C'est également le lieu de sécrétion du mucus et de la matrice péritrophique (260) (261). De plus, il est également montré que le jabot exprime de nombreux gènes impliqués dans la détoxification, ce qui souligne son rôle dans la neutralisation des composés supposés toxiques présents dans le bolus alimentaire avant son entrée dans l'intestin moyen (260) (261). Ces résultats reflètent une décomposition et une absorption séquentielle des aliments le long de l'intestin. De plus, chaque région forme une unité fonctionnelle spécialisée, contenant des EC ayant une forme particulière et exprimant un répertoire de gènes distincts.



**Figure 25 – Un aperçu de la diversification fonctionnelle des régions de l'intestin de la drosophile.**

Une analyse transcriptomique a été réalisée et a révélé un niveau d'expression génique régionalisée. Ce schéma illustre la stratégie séquentielle de digestion. La partie antérieure de l'intestin moyen est consacré à la digestion des macromolécules, alors que la région postérieure est spécialisée dans l'absorption des molécules. Source : Prise de (261).

### 4.1.3. Etude de la plasticité intestinale.

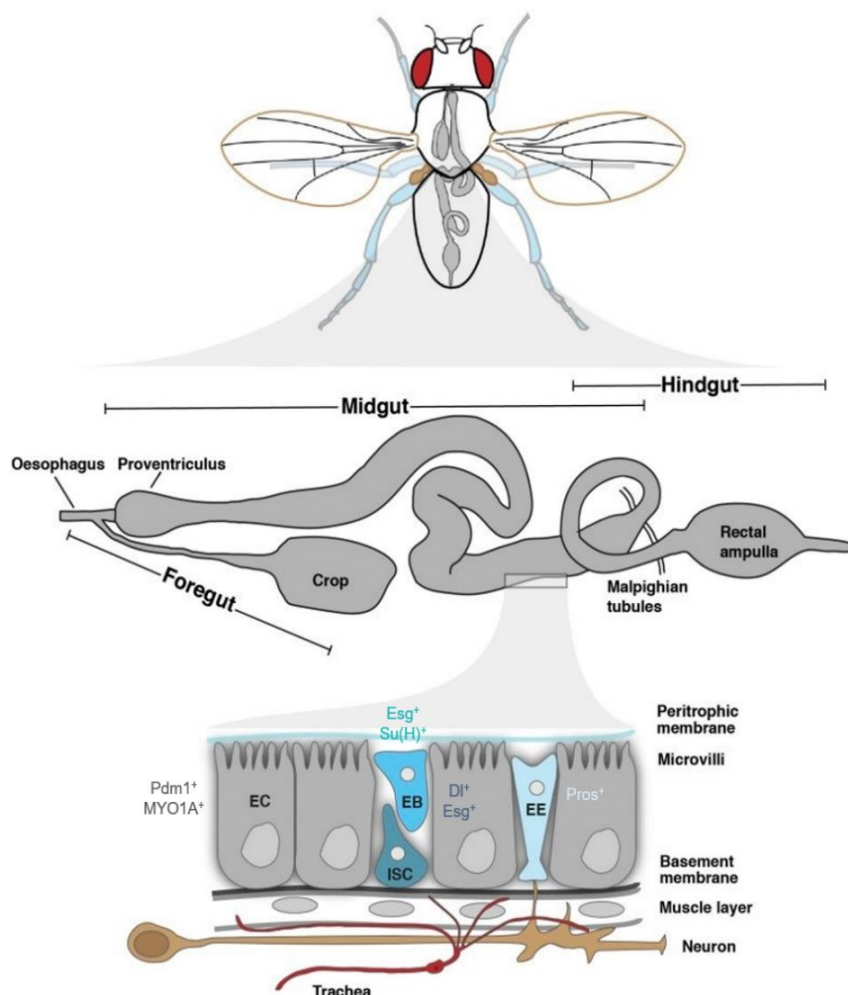
Comme son homologue mammifère, l'intestin moyen de la drosophile adulte est un organe très dynamique composé de cellules spécialisées qui remplissent principalement les fonctions de digestion, d'absorption de nutriments et d'eau, d'élimination des déchets et de production d'hormones. Les EC sécrètent des enzymes digestives, et absorbent et transportent les nutriments, tandis que les cellules entéro-endocrines (CEE) sécrètent des hormones intestinales qui régulent la mobilité et le fonctionnement de l'intestin en réponse à des stimuli externes et à des bactéries (254) (256). Il sert également de site majeur d'interaction avec l'environnement externe, qui comprend de nombreux microbes et produits chimiques (254) (256). Pour remplir ces multiples rôles, l'intestin doit être un organe hautement homéostatique qui s'adapte en réponse à la fois aux signaux environnementaux extrinsèques (ex : infection, lésions, etc...) et aux signaux organiques intrinsèques (ex : vieillissement, stress oxydatif, etc...). En effet, de multiples mécanismes existent dans l'intestin pour maintenir l'homéostasie tissulaire face au renouvellement naturel des cellules et aux dommages (265). Ici, nous discutons des divers mécanismes utilisés dans l'intestin de la drosophile pour maintenir cette homéostasie tissulaire appropriée.

#### a. Les mécanismes nécessaires à la plasticité du tube digestif.

L'intestin de la mouche adulte est un organe hautement régénératif qui a été largement utilisé ces dernières années comme système modèle pour caractériser le rôle des voies de signalisation qui coordonnent la prolifération et la différenciation des CSI dans le contexte de l'homéostasie et de la régénération. Il faut savoir qu'il est renouvelé toutes les deux semaines chez les femelles et environ une fois par mois chez les mâles (263) (264) (266) (267). C'est un tissu complexe constitué d'une série de cellules différenciées et de cellules progénitrices (268). La structure de base de l'intestin de la drosophile adulte consiste en un tube tapissé d'une monocouche épithéliale composée de quatre types de cellules entouré par des muscles viscéraux : les CSI multipotentes, les EC absorbantes, les CEE sécrétrices, et les EB, un type de cellule immature post-mitotique (Fig. 26) (256). Les CSI résidant dans l'intestin moyen sont uniformément intercalées parmi leur progéniture différenciée, et sont situées à la base à proximité des muscles viscéraux (Fig. 26) (256). Pour maintenir l'homéostasie tissulaire, les CSI ont la capacité de se diviser et de donner naissance à une nouvelle CSI et un progéniteur transitoire, l'EB. L'EB se différencie ensuite soit en une cellule d'absorption, les EC, ou éventuellement en une cellule sécrétrice, les CEE (263) (264).

Les CSI sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription, *Escargot* (*Esg*) de la famille des SNAIL, et du ligand de Notch, *Delta* (*DI*), et constituent la majorité des cellules capables de mitose dans l'intestin (Fig. 26) (263) (264). Au cours des épisodes de régénération, les CSI subissent une division asymétrique pour donner naissance à des progéniteurs bi-potents transitoires, les EB, qui conservent l'expression d'*Esg* mais

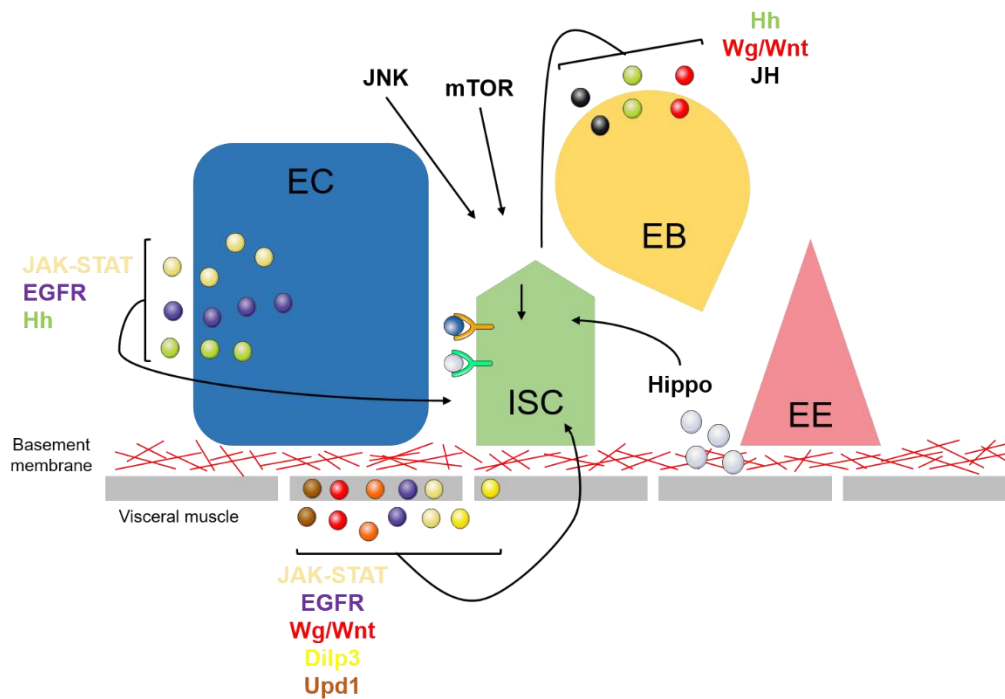
perdent l'expression de *D/tout* en activant la signalisation Notch (Fig. 26 et 28B) (263) (264). Lors de l'activation du récepteur Notch par DI, les EB expriment le facteur de transcription *Suppressor-of-hairless* (*Su(H)*) et se différencient principalement en EC absorbants polyploïdes, caractérisés par l'expression de la Myosine1A (*MYO1A*) et du facteur de transcription POU domain protein 1 (*Pdm1*) (Fig. 26 et 28B) (263) (264). Jusqu'à récemment, il était soutenu que les EC et les CEE étaient issues d'un progéniteur commun, l'EB, et qu'une forte activation de la signalisation Notch dans les EB les poussait à adopter un destin d'EC polyploïdes, tandis qu'une faible activation de la signalisation Notch les poussait à se différencier en CEE. Cependant, des travaux récents ont remis en question ce modèle, suggérant que la signalisation Notch n'est peut-être pas nécessaire dans la spécification et la différenciation des CEE. Il a été montré qu'il existait deux types de CEE dans l'intestin, produites dans des régions spécifiques : les CEE de classe I qui expriment le marqueur neuro-endocrinien *Prospero* (*Pros*) et les neuropeptides allatostatine (*Ast*) A, B et C, et les CEE de classe II *Pros*<sup>+</sup> qui expriment une combinaison spécifique de neuropeptides, tels que la tachykinine et l'hormone diurétique 31 (*DH31*) (Fig. 26) (269) (270). Il a été démontré que ces CEE sont générées à partir de CSI par le biais de progéniteurs distincts, appelés les pré-CEE *Pros*<sup>+</sup> et *DI*<sup>+</sup>, et non comme une alternative à la différenciation d'EC à partir d'une cellule EB commune (Fig. 28B) (271). Or, une autre étude a révélé que certains progéniteurs EB *Su(H)*<sup>+</sup> peuvent se différencier en CEE de classe II, alors que les CEE *Pros*<sup>+</sup> de classe I proviennent d'EB *Su(H)*<sup>-</sup> qui n'ont pas enregistré d'activation du récepteur Notch (269).



### Figure 26 - Composition cellulaire générale du tube digestif.

L'intestin moyen de la drosophile adulte consiste en un tube tapissé d'une monocouche épithéliale composée de quatre types de cellules : les CSI, les EC absorbantes, les CEE sécrétrices et les EB progéniteurs. De plus, cet épithélium est entouré de muscles viscéraux circulaires et longitudinaux, de nerfs et de trachées. **DI** : Delta ; **Esg** : Escargot ; **MYO1A** : Myosine1A ; **Pdm1** : POU domain protein 1 ; **Pros** : Prospero ; **Su(H)** : Suppressor-of-hairless. Source : Prise de (256).

Les CSI sont essentielles pour maintenir la régénération des tissus après une blessure, une apoptose ou à la suite d'attaques pathogènes. C'est pourquoi l'activité des CSI le long du tube digestif doit être spécifiquement et dynamiquement régulée pour ajuster le renouvellement des tissus aux besoins locaux et à l'échelle des tissus. Une multitude de signaux locaux, paracrines et systémiques et de voies de signalisation qui contrôlent la prolifération et la différenciation des CSI chez la drosophile ont été identifiés. Parmi eux, nous avons la voie Notch (266), Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) (267), Epidermal growth factor receptor (EGFR) (272) (272), l'insuline avec le Dilp3 (180) (273) (274), Jun-N-terminal Kinase (JNK) (275), Wg (276), mTOR (277), Hippo (278), et l'hormone juvénile (JH) (279) (Fig. 27). L'action combinée de ces voies de signalisation influence l'activité proliférative, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSI en réponse à un large éventail de signaux locaux, paracrines et systémiques. Par exemple pendant les cycles de jeûne et de réalimentation, la prolifération des CSI est stimulée et passe d'un mode asymétrique à un mode symétrique par l'action du Dilp3 dérivé des muscles viscéraux (Fig. 27) (274). En effet, les muscles viscéraux circulaires et longitudinaux qui entourent l'intestin moyen servent également de niche dynamique en fournissant des signaux spécifiques, dont Wingless (Wg), le ligand Vein (Vn) d'EGFR, le ligand Unpaired 1 (Upd-1) de JAK-STAT, ainsi que des molécules d'adhésion, telles que des intégrines, qui contrôlent le maintien et l'activité proliférative des CSI à la fois en homéostasie et pendant les épisodes de régénération après une lésion épithéliale (Fig. 27) (265) (267) (272). La différenciation des CSI est en outre contrôlée par la répression de Pdm1 par Esg, identifié comme étant un répresseur majeur des gènes de différenciation dans les cellules souches et progénitrices (280). Le tube digestif est donc un mélange complexe de cellules ayant une identité, une origine de développement et des états de différenciation distincts.



**Figure 27 - Mécanismes de régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches intestinales.**

Les différents mécanismes contrôlant la prolifération et la différenciation des CSI. **CEE** : Cellules entéro-endocrines ; **CSI** : Cellules souches intestinales ; **Dilp3** : *Drosophila* insulin-like peptide 3 ; **EB** : Entéroblastes ; **EC** : Entérocytes ; **EGFR** : Epidermal growth factor receptor ; **Hh** : Hedgehog ; **JAK/STAT** : Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription ; **JH** : Hormone juvenile ; **JNK** : Jun-N-terminal Kinase ; **mTOR** : mammalian Target of Rapamycine ; **Vn** : Vein ; **Upd1** : Unpaired-1 ; **Wg/Wnt** : Wingless. Source : Adaptée de (265).

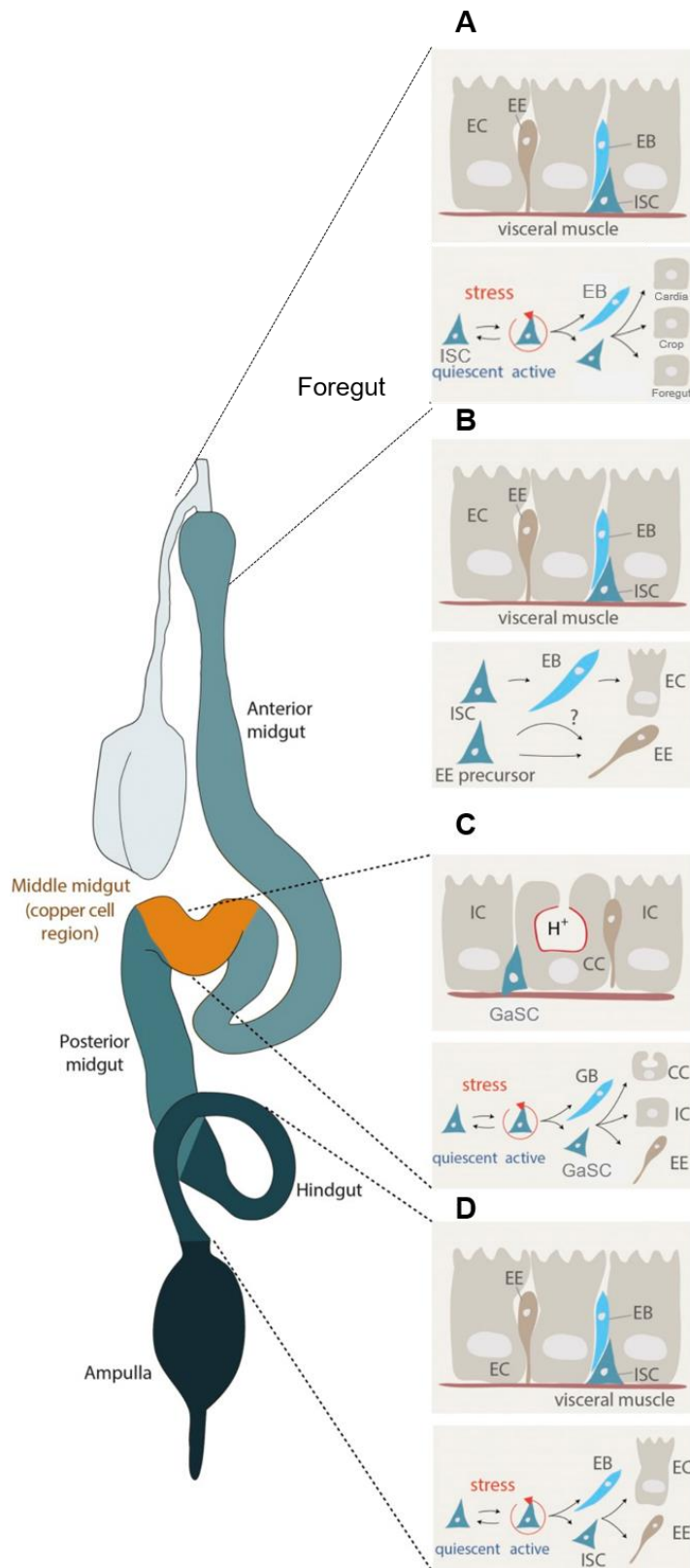
Or, la régionalisation anatomique de l'intestin est associée à des différences frappantes dans le renouvellement et la plasticité des différentes régions de l'intestin. Effectivement, il existe des variations substantielles de ce thème commun, tant au niveau de l'anatomie générale qu'au niveau cellulaire. Celles-ci sont principalement déterminées par l'origine du développement d'une région donnée de l'intestin, ainsi que par son emplacement spécifique le long de l'axe antéro-postérieur. Bien qu'il existe des différences significatives dans la composition et la fonction cellulaires des différentes régions de l'épithélium intestinal adulte, toutes les régions de l'intestin contiennent des CSI capables de régénérer tous les types de cellules de leur région particulière (281). La lignée de CSI a d'abord été caractérisée dans l'intestin moyen postérieur par deux groupes, simultanément (263) (264). Elles sont toutefois hétérogènes tant dans leur comportement cellulaire que dans l'expression des gènes, ce qui peut contribuer à préciser les différences de compartiment (261) (282). En accord avec cette idée, il a été montré que les CSI d'une certaine région ont tendance à maintenir la progéniture de leur région, et contribuent rarement à la production de cellules différenciées dans les régions adjacentes (282). Cette hétérogénéité des CSI est établie pendant la métamorphose et est ensuite maintenue en coopération avec les signaux régionaux des tissus environnants, tels que les muscles viscéraux (283).



Les CSI dans l'intestin moyen antérieur diffèrent à certains égards de celles dans l'intestin moyen postérieur. Par exemple, les taux de prolifération sont différents entre les CSI antérieures et postérieures (261). En effet, le taux de prolifération des CSI dans la région postérieure de l'intestin moyen est très élevé par rapport aux autres régions. De plus, une population particulière de CSI a été identifiée et désignée sous le nom de cellules souches gastriques (CSGa) (Fig. 28A) (284). Un pool de cellules souches multipotentes situé à la limite entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen au niveau du cardia peut se différencier et donner naissance à de nouvelles cellules pour le jabot, l'œsophage et le cardia (284). En effet, il a été montré que les cellules filles peuvent soit migrer vers l'intestin moyen antérieur, soit vers l'œsophage et le jabot (284). En outre, il a été découvert que la signalisation Wg/Wnt était nécessaire dans l'auto-renouvellement des CSGa, la signalisation Hedgehog (Hh) permet de réguler la différenciation des CSGa et la signalisation JAK-STAT pour contrôler la prolifération des progéniteurs dans cette région (Fig. 27) (284).

Alors que la plupart des CSI respectent le schéma de prolifération et de différenciation classique (Fig. 28B), il existe des CSI qui ne sont pas fonctionnellement équivalentes sur la longueur de l'intestin moyen. En effet dans la région des cellules de cuivre (« Copper cells ») de l'intestin moyen (R3), qui présente une certaine similarité avec l'estomac chez les vertébrés, une autre population de CSGa (*Df* et *Esg*<sup>+</sup>) a été révélée et qui ont la capacité de générer trois types de cellules différents : les cellules de cuivre sécrétant de l'acide (CC), les cellules interstitielles (IC) et les CEE de la région (Fig. 28C) (285). Comme la lignée de CSI dans l'intestin moyen postérieur, les gastroblastes (les EB dans cette région) ont été identifiés et proposés comme étant la cellule précurseur qui génère ces trois types de cellules différenciées (Fig. 28C) (285). L'analyse génétique révèle en outre que le maintien des CSGa dépend de la signalisation Wg/Wnt (Fig. 27) (285).

Les CSI de l'intestin postérieur résident dans un compartiment étroit en amont du pylore, rappelant le pool de cellules souches de la jonction entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen, tandis que leur progéniture migre vers l'extrémité postérieure (286). Contrairement à ce qui se passe dans l'intestin moyen de la mouche, le renouvellement de l'épithélium de l'intestin postérieur ne se produit pas de la couche basale des cellules vers la lumière mais plutôt le long de l'axe antéro-postérieur (286). Elles permettent ainsi de générer toutes les cellules adultes de l'intestin postérieur (Fig. 28D) (286) (287). L'auto-renouvellement ainsi que la prolifération et la différenciation de ces CSI sont sous le contrôle des voies de signalisation Wg/Wnt et Hh (Fig. 27) (286). L'expression de Wg/Wnt dans cette zone de prolifération agit comme un signal de niche qui permet le maintien des cellules dans un mode de cycle lent et d'auto-renouvellement (286). Lorsque les cellules se divisent et s'éloignent de la source Wg/Wnt par la suite, elles entrent dans une phase de prolifération rapide. Durant cette phase, le signal Hh est nécessaire pour sortir du cycle cellulaire et commencer la différenciation (286). Toutefois à l'inverse de l'intestin moyen endodermique, les régions ectodermiques (intestin antérieur et postérieur) sont plus tranquilles (287).



**Figure 28 - Lignage de l'intestin adulte de la drosophile.**

(A - D) Représentation schématique du lignage dans l'intestin antérieur (A), l'intestin moyen (B), la région des cellules de cuivre (« Copper cells ») (C), et l'intestin postérieur (D). CC : Cellules de cuivre (« Copper cells ») ; EB : Entéroblastes ; EC : Entérocytes ; EE/CEE : Cellules entéro-endocrines ; GaSC/CSGa : Cellules souches gastriques ; GB : Gastroblastes ; IC : Cellules interstitielles ; ISC/CSI : Cellules souches intestinales. Source : Adaptée de (256) et (265).

## **b. Effets du vieillissement sur l'appareil digestif de la drosophile.**

Chez les organismes adultes, l'équilibre entre l'élimination des cellules mortes et la production de nouvelles cellules par les CSI est essentiel pour maintenir l'homéostasie tissulaire locale et la fonctionnalité de l'organe, mais chez les organismes âgés, les CSI connaissent une baisse de leur comportement biologique. Ceci est particulièrement préjudiciable pour les tissus qui ont un taux de rotation élevé, tels que l'épithélium intestinal. L'homéostasie intestinale est essentielle à la santé de l'organisme et sa perturbation est associée à un large éventail de pathologies allant des troubles intestinaux inflammatoires aux cancers intestinaux.

La seule combinaison de marqueurs qui marque clairement une CSI est l'expression du facteur de transcription *Esg* et du ligand de Notch, *Dl*. Toutefois, cela n'est vrai que pour un intestin jeune et sain. L'intestin âgé d'une mouche adulte présente des caractéristiques apparentes, telles que la multiplicité des couches de cellules absorbantes, la mauvaise expression des gènes spécifiques aux types de cellules et l'hyperprolifération des CSI (254). Chez les mouches vieillissantes, les CSI deviennent hyperprolifératives, ce qui entraîne une accumulation de cellules mal-différenciées qui co-expriment des marqueurs de cellules souches et progénitrices (comme *Dl* et *Esg*) et des marqueurs de différenciation (comme la polyploïdie), suite à une activation aberrante de la signalisation Notch qui perturbe la décision du devenir des cellules filles (254) (275). Cela a pour conséquence de compromettre sa fonction de barrière intestinale, ce qui implique un raccourcissement de la durée de vie (147) (180). En effet, il existe une forte corrélation entre le degré d'apparition de ces changements intestinaux et la longévité de l'organisme (180), ainsi qu'entre l'apparition de la dysbiose microbienne intestinale et la durée de vie (288). Or, une protection des mouches contre la dysplasie intestinale ou la dysbiose microbienne a des effets bénéfiques sur l'homéostasie intestinale et peut augmenter la durée de vie des mouches (67) (180) (288) (289). Cependant, une étude récente a révélé que la dysplasie liée à l'âge et la dégradation de la barrière intestinale sont toutes deux plus prononcées chez les femelles fécondées que chez les mâles (290). Dans la même étude, il a été constaté que les mouches mâles étaient plus sensibles aux infections intestinales aiguës et au stress xénobiotique (290). Toutes ces observations pourraient s'expliquer au moins en partie par le taux de prolifération plus élevé des CSI femelles, qui pourrait aider les femelles à régénérer plus rapidement leur intestin moyen après les infections, mais pourrait également le rendre plus vulnérable à la dysplasie liée à l'âge (291).

Des études antérieures ont montré que la compartimentation intestinale diminue avec l'âge (260). Une étude a dévoilé le rôle critique de la région gastrique de l'intestin moyen (R3) dans le dysfonctionnement intestinal lié à l'âge (292). En effet, il a été dévoilé que la région des cellules de cuivre dans l'intestin moyen, semblable à l'estomac, contrôle la distribution et la composition du microbiote (292). Or, une altération dans la composition du microbiote (dysbiose) se développe dans les intestins vieillissants, et est étroitement liée au dysfonctionnement de la barrière intestinale associé à l'âge chez la drosophile (288) (293). Ainsi, le développement d'une métaplasie de l'épithélium gastrique, induite par l'activation chronique de la voie JAK/STAT, émerge comme l'origine des changements physiopathologiques liés à l'âge dans le tractus gastro-intestinal de

la drosophile, où les cellules de cuivre se transdifférencient en cellules de type EC de l'intestin moyen ( $Pdm1^+$ ), compromettant ainsi l'acidité de la région gastrique (292). Ce changement de pH entraîne des modifications dans la compartimentation et la composition du microbiote, ce qui entraîne finalement une dysbiose commensale et une dérégulation de l'immunité innée dans l'épithélium de l'intestin moyen (292). La dysbiose, à son tour, déclenche une réponse inflammatoire chronique, qui endommage l'épithélium et provoque une activité excessive des CSI (292). La dysplasie épithéliale qui en résulte contribue à son tour à la perte de la fonction de la barrière intestinale, ce qui entraîne finalement un raccourcissement de la durée de vie (292).

Par ailleurs, des études récentes ont révélé que divers réseaux de gènes sont responsables de la progression de ces phénotypes âgés. La dysplasie intestinale liée au vieillissement est associée à une augmentation de l'activité de la signalisation JNK et/ou de celle de PDGF (Platelet-derived growth factor)/VEGF (Vascular endothelial growth factor) (275) (294), et les facteurs qui contribuent à la dysplasie dans l'intestin vieillissant comprennent un déclin de la fonction mitochondriale dans les cellules souches et progénitrices, une dysbiose des commensales de l'intestin, une inflammation chronique, et une augmentation du stress du réticulum endoplasmique (RE) (67) (288) (289). Les CSI des vieilles mouches présentent également de fréquentes mutations somatiques qui modifient leur comportement, conduisant à des néoplasies spontanées (295). Il a été démontré que ces néoplasies dérivées de CSI déficientes en Notch déclenchent une dérégulation des signaux de niche des CSI, notamment les ligands d'EGFR et les cytokines qui activent la signalisation JAK/STAT, contribuant ainsi à leur établissement et à leur développement (296).

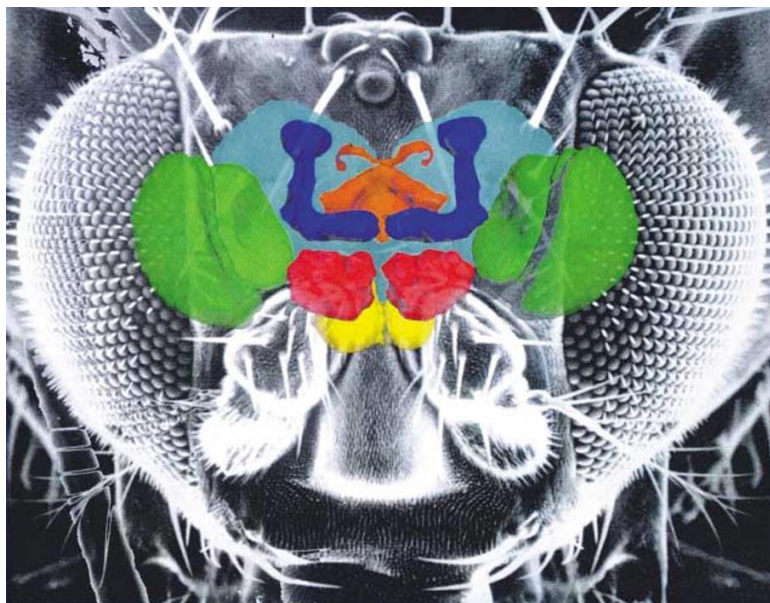
## 4.2. Le système nerveux central de la drosophile.

Le système nerveux central de la drosophile est divisé en deux grandes parties : la chaîne nerveuse ventrale comprenant les ganglions thoraciques et abdominaux reliés au système nerveux périphérique, et le cerveau. Le cerveau fonctionne selon les mêmes principes généraux que celui des mammifères, mais avec une organisation particulière (297). Les corps cellulaires des neurones sont massés à la périphérie, tandis que les projections axonales et dendritiques se regroupent au centre pour former le neuropile. Le cerveau de la drosophile est traversé par le tube digestif de manière antéro-postérieure, divisant celui-ci en ganglions supra- et sub-œsophagiens. Le ganglion sub-œsophagien, situé ventralement à l'œsophage, est impliqué dans le traitement des informations gustatives (Fig. 29). Il reçoit l'information relayée par les neurones gustatifs présents au niveau des palpes labiaux, des pattes et des ailes qui envoient leurs dendrites jusqu'au bout des soies, permettant un contact direct avec les molécules présentes dans l'environnement. Le ganglion supra-œsophagien est plus volumineux, se situe dorsalement à l'œsophage et se compose de trois parties :

- le *protocerebrum* qui est composé de quatre structures : les lobes optiques, la *pars intercerebralis (IPC)*, le complexe central et les corps pédonculés (« mushroom bodies » en anglais). Les lobes optiques situés de part et d'autre du cerveau sont impliqués dans le traitement des informations visuelles (Fig.

- 29). La *pars intercerebralis (IPC)* est considérée comme l'équivalent du système neuroendocrinien central. Elle contient des cellules neurosécrétoires qui projettent leurs axones vers la glande annulaire, un complexe de glandes endocrines périphériques, dont certaines d'entre elles ont été caractérisées comme des cellules productrices d'insuline. Le complexe central inclut le pont protocérébral, le corps en éventail, deux nodules et les corps ellipsoïdes (Fig. 29). De par sa position, il est essentiellement impliqué dans le comportement locomoteur (298) (299) (300), ainsi que dans le comportement de parade nuptiale des mâles (301). Les corps pédonculés constituent une structure bilatérale selon l'axe de symétrie du cerveau et sont séparés du reste du neuropile par une couche de cellules gliales (Fig. 29). Ils jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, tels que le comportement de cour (301), l'activité locomotrice (302), mais ils ont surtout été identifiés comme le centre de l'apprentissage et de la mémoire olfactive (303).
- le *deutocerebrum* qui est principalement constitué des lobes antennaires et des lobes dorsaux (Fig. 29). Il traite les informations sensorielles des antennes. Les lobes dorsaux contiennent des motoneurones qui contrôlent les muscles antennaires.
  - le *tritocerebrum* qui est composé de deux petits lobes bilatéraux reliés par un faisceau de fibres nerveuses appelé « commissure », dont la composition et la fonction restent mal décrites. Ils seraient impliqués dans le contrôle des interactions entre le proboscis et le tube digestif, via les nerfs stomatogastriques.

Avec l'allongement de l'espérance de vie, les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson sont devenues une menace croissante pour la santé humaine dans le monde entier. En effet, la prévalence aux maladies neurodégénératives est plus forte chez les personnes âgées. Outre les déficits comportementaux, le vieillissement cérébral chez la drosophile est caractérisé par l'apparition progressive de phénotypes dégénératifs avec l'âge, tels que la mort neuronale et l'axonopathie. Cette neurodégénérescence se manifeste par la formation de lésions vacuolaires (vacuolisation) dans le neuropile du cerveau central et dans les lobes optiques de la mouche.



**Figure 29 – Visualisation du cerveau d'une drosophile adulte.**

Vue frontale en 3D du cerveau d'une drosophile adulte. Les principales structures qui composent le cerveau d'une drosophile adulte sont représentées par les codes couleur suivants : **vert** : les lobes optiques ; **jaune** : les ganglions sub-œsophagiens ; **rouge** : les lobes antennaires ; **bleu** : les corps pédonculés et **orange** : le complexe central. Source : Prise de (303).

### 4.3. Le corps gras de la drosophile.

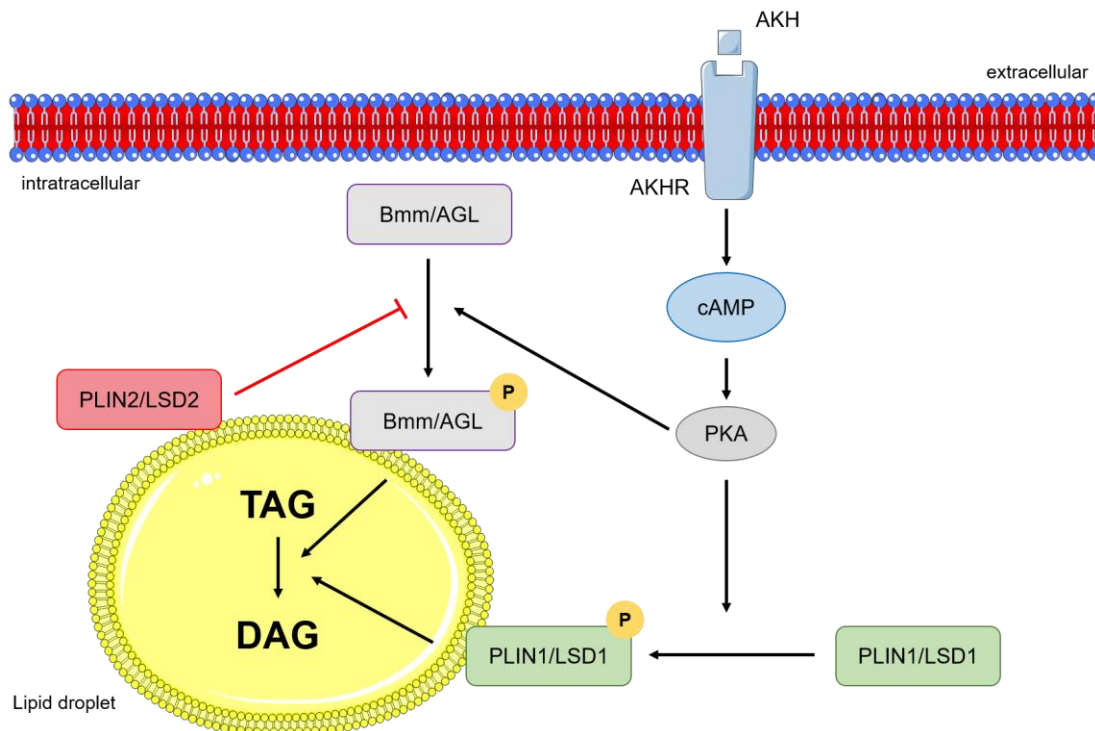
Le corps gras de la drosophile représente le principal centre métabolique dans le contrôle du stockage et de l'utilisation des réserves énergétiques (graisses et glycogène). Il fonctionne principalement en détectant les conditions nutritionnelles et en réagissant par la synthèse (lipogenèse/glycogenèse) ou la libération d'énergie (lipolyse/glycolyse) afin de répondre aux demandes énergétiques de la mouche pendant toutes les étapes de son développement (304) (305). Ces fonctions du corps adipeux sont considérées comme équivalentes à celles du tissu adipeux et du foie chez les mammifères (305). Pendant le développement et la surcharge calorique, le corps adipeux d'insecte accumule une grande majorité des réserves énergétiques et exécute la lipolyse/glycolyse lorsque l'énergie des nutriments stockés est nécessaire à la survie pendant la métamorphose, le jeûne ou la production d'œufs. Il sécrète également des protéines et des peptides pour affecter directement le développement d'autres organes et tissus (304) (305).

Le corps gras larvaire et le corps gras adulte sont composés de deux lignées cellulaires différentes. Néanmoins, les corps gras à ces deux stades jouent le même rôle crucial dans le stockage des graisses. Le corps gras larvaire représente un organe contigu d'un nombre assez constant de grandes cellules endorépliques post-mitotiques (adipocytes), qui subissent une histolyse peu après l'envol de la mouche adulte, et les cellules adipeuses spécifiques de l'adulte émergent alors (305). En revanche, le corps gras adulte est composé de cellules diploïdes provenant d'amas de cellules adipeuses progénitrices encore méconnues (305). Contrairement

chez la larve, les cellules du corps gras adulte sont affectées à divers dépôts de tissu adipeux non reliés entre eux, tels que le corps gras péricérébral, le corps gras péricardique et le corps gras sous-cutané abdominal. Les principales caractéristiques cellulaires des corps gras tant larvaires qu'adultes sont les gouttelettes lipidiques, les organites universels du stockage intracellulaire des graisses, qui sont régulièrement colorés par des colorants lipophiles tels que l'Oil-Red-O (ORO), le BODIPY 493/503 ou le Nile Red pour l'imagerie microscopique. Elles sont constituées d'un noyau de lipides neutres (TG et esters de cholestérol) entouré d'une monocouche de phospholipides qui est associée à une variété de protéines spécifiques associées aux gouttelettes lipidiques (Fig. 30) (305). Les cellules du corps gras des mouches sont multiloculaires, ce qui signifie qu'elles contiennent des populations de gouttelettes lipidiques de tailles différentes (305).

La régulation de l'homéostasie des lipides est cruciale pour les animaux. Les réserves lipidiques sont généralement étroitement régulées pour répondre aux besoins énergétiques sans dépasser un seuil d'adiposité maximum. L'homéostasie du stockage des lipides et la dynamique des gouttelettes lipidiques sont contrôlées par l'équilibre entre la lipolyse et la lipogenèse. Alors que les adipocytes des corps gras sont des cellules d'une grande plasticité, capables de stocker de grandes quantités de TG, un dépôt extrême de lipides peut provoquer une hypertrophie du corps adipeux et provoquer l'obésité chez les mouches comme chez les Hommes, ainsi qu'une foule de complications physiopathologiques. En effet, les mouches présentant un excès de stockage de graisses d'origine environnementale présentent souvent une hyperglycémie, une insulino-résistance, une arythmie, une fibrose cardiaque et une réduction de la longévité, également observées chez l'Homme (306). Lorsque les nutriments sont abondants, le corps gras absorbe les lipides ou les glucides alimentaires présents dans l'hémolymphe, les estérifie et les stocke sous forme de TG, d'esters de cholestérol ou de glycogènes dans les gouttelettes lipidiques des cellules adipeuses. En période de demande énergétique, l'organisme accède aux réserves de triacylglycérols (TAG) par l'action coordonnée des lipases et où les TAG sont alors dégradés en diacylglycérols (DAG). Cette régulation lipolytique se produit principalement à la surface des gouttelettes lipidiques grâce à l'accessibilité de diverses lipases. Dans des conditions pauvres en nutriments, de nombreuses lipases sont recrutées au niveau des gouttelettes lipidiques afin de favoriser la libération d'AG supplémentaires à partir des TAG. Les gouttelettes lipidiques des adipocytes chez les mammifères, ainsi que des cellules adipeuses chez la drosophile, présentent ainsi un remodelage en réponse à la stimulation des signaux hormonaux. Effectivement, la mobilisation des lipides de stockage à partir des gouttelettes lipidiques dépend de l'hormone adipokinétique (AKH) synthétisée par les cellules neurosécrétoires du *corpus cardiacum*, puis libérée dans l'hémolymphe (304) (305). La voie AKH est fonctionnellement analogue à la signalisation du glucagon chez les mammifères et représente la voie lipocatabolique la plus importante requise pendant les conditions de jeûne (Fig. 30) (304) (305). L'AKH fonctionne par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. La liaison du peptide AKH à son récepteur couplé à la protéine G (AKHR) à la surface des cellules du corps gras déclenche la voie de signalisation canonique AMP cyclique (cAMP)/protéine kinase A (PKA) (Fig. 30) (304) (305). L'activation de PKA dépendante de l'AMPc orchestre au moins deux réponses pro-lipolytiques différentes (Fig. 30). D'une part, la protéine PKA activée phosphoryle la lipase brummer (*bmm*), qui code l'homologue de l'ATGL

(adipose trilinear glyceride lipase) chez la mouche, la principale lipase TG des mammifères (307). Bmm se localise à la surface des gouttelettes lipidiques agissant comme une lipase pour stimuler la lipolyse. Or pour rendre les gouttelettes lipidiques accessibles aux lipases, des protéines spécifiques sont nécessaires avec notamment la protéine périlipine 1 (PLIN1), également appelée « lipid storage droplet 1 » (LSD1), associée à la gouttelette lipidique. Une fois phosphorylée par PKA, cette protéine conservée au cours de l'évolution favorise ainsi l'accès des lipases TG à la surface de la gouttelette lipidique, permettant ainsi la mobilisation des lipides de stockage (Fig. 30) (308). Elle rend ainsi la graisse stockée métaboliquement accessible pour répondre aux demandes énergétiques des différents tissus cibles (Fig. 30) (308). En outre, le génome de la drosophile code pour une deuxième périlipine, la PLIN2/LSD2. Cette dernière favorise en revanche le stockage des graisses dans les gouttelettes lipidiques (Fig. 31) (309). En résumé, la PLIN2 est impliquée dans la promotion de l'accumulation des lipides en agissant comme une barrière face aux lipases, tandis que la PLIN1 est impliquée dans l'activation de la lipolyse. Enfin, les produits de cette dégradation sont ensuite transportés vers divers tissus cibles pour soutenir la croissance et la survie en réponse aux demandes énergétiques.

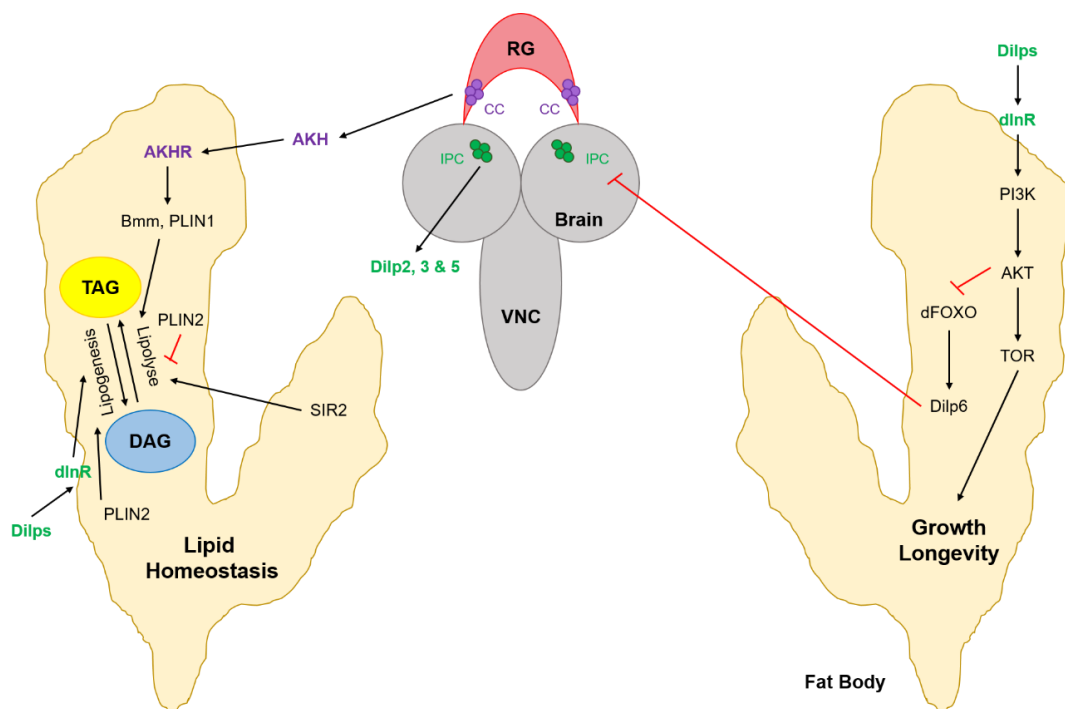


**Figure 30 – Modèle de stockage et de mobilisation des lipides dans le corps gras de la mouche.**

L'AKH augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc. L'AMPc active ensuite la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) qui, à son tour, phosphoryle les lipases (comme Bmm), ce qui les transloque du cytosol à la surface des gouttelettes lipidiques et conduit à la production de DAG. La PLIN2/LSD2 s'assemble à la surface des gouttelettes lipidiques et agit comme une couche protectrice contre la lipolyse induite par la lipase Bmm. En revanche, la phosphorylation de la PLIN1 est déterminante dans la mobilisation des graisses du corps gras. **AKH** : Hormone adipokinétique ; **AKHR** : Récepteur d'AKH ; **bmm** : brummer ; **cAMP** : AMP cyclique ; **DAG** : Diacylglycérides ; **LSD1/2** : Lipid storage droplet 1/2 ; **P** : Phosphorylation ; **PKA** : Protéine kinase A ; **PLIN1/2** : Périlipine 1/2 ; **TAG** : Triacylglycérides. Source : Adaptée de (305).



Le corps gras est également une source majeure de nombreux peptides et facteurs de croissance impliqués dans la longévité et le vieillissement (Fig. 31). L'homéostasie des lipides pourrait également influencer le vieillissement et la durée de vie des animaux. En l'occurrence, la voie IIS et la voie de signalisation mTOR ont une grande relation avec l'homéostasie des lipides et la durée de vie (Fig. 31). De nombreuses études ont montré que les Dilp sécrétés par les IPC favorisent la lipogenèse (Fig. 31) (304). Or, la réduction de la signalisation de l'insuline/IGF prolonge la durée de vie de diverses espèces, dont la drosophile (85) (86) (142). En revanche, la surexpression spécifique de *FOXO* dans le corps gras de la drosophile tend à prolonger la durée de vie (310). Une récente étude a révélé que le facteur de transcription FOXO module positivement l'ARNm du *Dilp6* dans le corps gras adulte, ce qui entraîne une augmentation de la durée de vie (Fig. 31) (143). De plus, l'expression du *Dilp6* dans le corps adipeux adulte inhibe celle du *Dilp2* et du *Dilp5* dans le cerveau, ainsi que la sécrétion de Dilp2 dans l'hémolymphe (Fig. 31) (143). En fonction du régime alimentaire, la surexpression de la *dSir2* prolonge également la durée de vie. La *dSir2* est une désacétylase dépendant du  $NAD^+$ , qui favorise la mobilisation des réserves de graisse (Fig. 31). Le KO de la *dSir2* dans le corps gras de l'adulte entraîne une dérégulation du métabolisme des lipides, impliquant une altération de l'expression de gènes métaboliques clés et la perte de l'allongement de la durée de vie (311). De plus, les troubles du métabolisme des lipides peuvent également entraîner un stockage des lipides dans des tissus non adipeux. Cela conduit à une lipotoxicité qui a des conséquences néfastes sur la santé, comme le montre l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules gliales ce qui favorise la neurodégénérescence (312).



**Figure 31 – L'axe cerveau - corps gras.**

**AKH** : Hormone adipokinétique ; **AKHR** : Récepteur d'AKH ; **bmm** : brummer ; **CC** : *Corpus cardiacum* ; **DAG** : Diacylglycérides ; **Dilp** : *Drosophila* insulin-like peptides ; **dInR** : *Drosophila* insuline-like receptor ; **IPC** : *Pars intercerebralis* ; **PLIN1/2** : Périlipine 1/2 ; **RG** : Ring gland ; **TAG** : Triacylglycérides ; **VNC** : Ventral neural cord. Source : Adaptée de (305).

# HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait identifié un nouveau snoARN chez la *D. melanogaster*, qui n'a fait l'objet d'aucune étude publiée jusqu'à ce jour (313). En outre, ils ont montré que ce nouveau snoARN est très bien conservé chez les mammifères (313). Le snoARN *jouvence* (le nom qui lui a été attribué) a été découvert par hasard lors d'une étude sur les effets du vieillissement sur les performances sensori-motrices. Dans le cadre de cette étude, un mutant de perte de fonction *jouvence* a été généré en utilisant des approches classiques de génétique chez la drosophile, ce qui a provoqué une petite délétion de la région génomique contenant *jouvence* (313). En vue des résultats, l'hypothèse générale que *jouvence* pourrait être un nouveau déterminant génétique du vieillissement chez la drosophile avait été posée. En plus d'entraîner précocement une diminution de l'activité locomotrice des mouches, ils ont admis que la mutation de *jouvence* peut aussi provoquer des effets impressionnants sur la longévité des mouches femelles (313). En effet, la délétion de *jouvence* a provoqué un raccourcissement de la durée de vie des mouches par rapport aux type sauvages, alors que les lignées transgéniques ré-exprimant le fragment d'ADN comprenant les régions génomiques et régulatrices du snoARN dans le fond génétique mutant ont été capables de restaurer leur longévité (313). De même, dans le contexte sauvage, la surexpression de *jouvence* a permis d'étendre la durée de vie des mouches (313).

Plus loin dans l'étude, ils découvrent que *jouvence* est exprimé dans le nucléole des cellules épithéliales de l'intestin, et plus précisément dans les EC, ainsi que dans les cellules nourricières de l'ovaire (313). Par la suite, ils montrent que les effets de *jouvence* sur la longévité sont dus à son expression spécifique dans les cellules épithéliales intestinales. Les résultats obtenus confirment bien que l'expression ciblée de *jouvence* spécifiquement dans l'intestin, voire dans les EC, est requise et suffisante pour influencer la longévité des mouches femelles en prolongeant leur durée de vie (313). Or vu cette localisation particulière dans les EC, nous avons suggéré que la mutation de *jouvence* pouvait provoquer d'éventuelles lésions intestinales au niveau organisationnel, cellulaire et moléculaire, et perturberait ainsi l'homéostasie intestinale. Ainsi, l'objectif principal de mon projet de thèse découle directement de ces observations, et porte sur la détermination du rôle fonctionnel de *jouvence* dans l'épithélium intestinal de la drosophile. Pour cela, ma thèse a été de caractériser les effets de la perte de *jouvence* dans l'intestin. Afin de vérifier cette hypothèse, notre stratégie s'est articulée en deux grands axes distincts avec notamment une approche cellulaire/organisationnelle et une approche métabolique.

## Approche cellulaire et organisationnelle :

Pour restaurer l'intégrité du tissu et assurer un état physiologique fonctionnel de l'organe, les CSI multipotentes sont activement sollicitées. Une régulation fine de leur capacité proliférative est alors indispensable. Or, ce mécanisme est dérégulé au cours du vieillissement. En effet, les mouches vieilles présentent une désorganisation tissulaire liée à l'âge dans l'intestin, notamment caractérisée par une

organisation anormale de l'épithélium, une augmentation dérégulée de la prolifération des CSI (hyperprolifération), une accumulation d'EB, ou encore par la présence accrue de cellules mal-différenciées (180). De plus, il est bien connu que ces défauts dans le maintien de l'homéostasie intestinale entraînent une courte durée de vie chez les mouches adultes (180). Nous avons donc voulu voir si ce phénomène pouvait s'observer chez les mutants *jouvence* par rapport à sa localisation spécifique dans l'épithélium intestinal et ses effets sur la longévité. Dans cette partie, nous passerons en revue les impacts systémiques de la mutation de *jouvence* dans la physiologie cellulaire. Nous avons donc entrepris de caractériser le dynamisme des cellules progénitrices chez l'adulte avec pour objectif le fait de déterminer la contribution de *jouvence* dans l'homéostasie intestinale et la physiologie de l'organisme. Pour cela, nous avons déterminé le nombre de différents types cellulaires chez les jeunes et les vieilles mouches. Une partie de ces investigations ont fait l'objet d'une publication apparue en Février 2020 dans *Nature Communications*. Nous démontrons que *jouvence* permet de prévenir cette hyperprolifération observée chez les vieilles mouches et renforcent l'hypothèse d'un rôle essentiel du snoARN dans l'homéostasie intestinale.

Les résultats acquis lors de cette étude ont par ailleurs permis d'investiguer de l'impact de *jouvence* sur la croissance intestinale. Nous avons ainsi mesuré la longueur de l'intestin des mouches mutantes et nous avons découvert que celle-ci était modifiée. En effet, les mutants *jouvence* présentent une réduction significative de la taille de leur intestin, alors que sa surexpression permet de la restaurer. De plus, nous montrons que le niveau d'expression local du ligand Dilp3 sécrété par les muscles viscéraux est dérégulé chez les mutants et démontrant que ces effets peuvent influencer considérablement la croissance de l'intestin.

## Approche métabolique :

Il est probable que la digestion des aliments et l'absorption des nutriments soient perturbées dans l'intestin moyen des mutants en raison du nombre élevés d'EC polypléides. Une première étude met en évidence que les mouches mutées pour le snoARN *jouvence* présentent une hypertrophie du corps gras, visible tant au niveau de l'abdomen qu'autour du cerveau (données non présentées). De plus, la quantification des TG et du cholestérol a permis de confirmer cette hypertrophie, d'où le qualificatif de mouches dites « obèses ». Cette perturbation métabolique suggère une implication de *jouvence* dans le métabolisme lipidique. L'objectif est alors de caractériser l'origine de ces dommages métaboliques dans le corps gras et de déterminer les effets de l'invalidation du snoARN *jouvence* sur le métabolisme énergétique. Pour cela, un séquençage d'ARN sur les tissus intestinaux a été réalisé et a démontré que de nombreux gènes, dont le gène *ninaD*, impliqués dans différentes voies métaboliques importantes sont dérégulés chez le mutant *jouvence*.

Par la suite, nous nous sommes penchés plus en détails sur la caractérisation du rôle fonctionnel de *ninaD*, un homologue du récepteur Scavenger de classe B, type I (SR-BI) chez les mammifères, impliqué dans l'absorption du cholestérol et des lipides. Alors que ce dernier est surexprimé chez les mouches nulles pour

*jouvence*, nous révélons que son inhibition permet de maintenir une homéostasie normale des lipides chez les mutants, accompagnée d'une prolongation de la durée de vie et d'une protection contre la neurodégénérescence (caractéristique largement observée chez les vieilles mouches). Ces résultats font l'objet d'un second article qui sera prochainement soumis à *Current Biology*.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Maintien des lignées stock de drosophile.

Les lignées de drosophiles utilisées sont élevées à densité contrôlée dans des tubes de 50 millilitres de volume, contenant 10 à 15 millilitres de milieu nutritif standard composé des éléments suivants (pour un litre) : 1,04% d'agar, 8% de levure de bière, 8% de farine de maïs et 2% de para-hydroxy-benzoate de méthyle (Nipagine) préalablement dilué dans 20% d'éthanol absolu, utilisé pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques (notez que nos milieux ne contiennent pas de sucre). Les drosophiles sont ainsi maintenues dans un incubateur à une température de 25°C, avec une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité et une humidité de 65%. Elles sont transférées dans des tubes frais après leur éclosion et laissées pour pondre sur le milieu, où elles sont soit transférées dans un nouveau tube pour amplifier le stock, soit éliminées. Après éclosion, les progénitures adultes sont récoltées dans de nouveaux tubes. Pour éviter la surpopulation larvaire dans tous les flacons, 25 femelles et 10 mâles adultes sont déposés par tube. Après trois jours d'accouplement, les mâles sont éliminés et les femelles mises à vieillir pendant 7 à 40 jours dans un tube contenant du milieu neuf et transférées sur un nouveau milieu tous les deux jours précisément.

Les mouches *Canton-S (CS)*, rétrocroisées sur dix générations, ont été utilisées comme contrôle. Tous les résultats décrits dans cette étude ont été exclusivement obtenus sur des femelles. Tous les génotypes ont été rétrocroisés avec le type sauvage pendant au moins six générations pour homogénéiser le fond génétique. Certaines lignées pilote ont une activité *Gene-Switch-GAL4 (GAL4-GS)*, induite par l'ajout de mifépristone (RU486) dans la nourriture. Le RU486 (*Sigma-Aldrich*, Cat. #M8046) a été dissout dans de l'éthanol absolu à 25 mg.mL<sup>-1</sup> et mélangé dans le milieu lors de la préparation des flacons de nourriture à une concentration finale de 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Les différentes lignées pilote (« drivers ») *GAL4* et *GAL4-GS* utilisées au cours de cette thèse ont été résumés dans le tableau V, alors que le tableau VI répertorie quant à lui les différents transgènes *UAS* utilisés. La plupart de ces lignées ont ensuite été introduites dans le fond de délétion par des croisements génétiques standards. Cependant, plusieurs lignées transgéniques telles que l'*UAS-jou*, *UAS-sno2*, *UAS-sno3*, *UAS-sno2&3* (Tabl. VI) ou encore les lignées de surexpression comme *GR4* et *GR6* (Tabl. VIII), mais aussi la lignée pilote *Mex-GAL4-GS* (Tabl. V), ont été générées au laboratoire. Concrètement, la construction des plasmides, les clonages, etc... ont été réalisés au laboratoire, mais les mouches transgéniques ont été générées par BestGenes ([www.thebestgene.com](http://www.thebestgene.com), USA). Les différentes étapes de construction de ces lignées sont détaillées dans l'article (313).

Toutes les mouches utilisées pour les expériences sont *Wolbachia (-)* (sauf indications contraires). La présence de *Wolbachia* a été vérifiée par PCR en utilisant une combinaison d'amorces spécifiques (Tabl. VII). Les lignées préalablement positives ont été traitées, soit à la tétracycline (*Sigma-Aldrich*, Cat. #87128) pour

éliminer le *Wolbachia*, soit recroisées avec une lignée sauvage *Wolbachia* (-). Après re-vérification après traitement, comme nous avons constaté que certaines lignées redevenaient *Wolbachia* (+) après quelques générations, nous avons donc définitivement et systématiquement opté pour la deuxième solution, c'est-à-dire un re-croisement avec une lignée *Wolbachia* (-).

D'autres lignées ont été utilisées au cours de cette étude comme la lignée mutante *ninaD*<sup>P245</sup> (ou encore appelée *ninaD*<sup>1</sup>) et le double-mutant *F4,ninaD*<sup>P245</sup> (*F4, ninaD*<sup>1</sup>) (Tabl. VIII). Le double-mutant *F4,ninaD*<sup>P245</sup> a été conçu au laboratoire par des croisements standards. La lignée a été obtenue par recombinaison puisqu'elles sont toutes les deux situées sur le second chromosome. En bref, un croisement entre les mouches mutantes nulles pour *jouvence* (*F4*) et le mutant nul *ninaD*<sup>P245</sup> a été réalisé. La progéniture de ce croisement a ensuite été analysée par PCR sur l'ADN génomique pour vérifier la délétion de *jouvence* à partir du couple d'amorces du tableau VII. Une fois validée, les produits de PCR ont été séquencés par *Eurofins Genomics* (France) pour rechercher la présence de la mutation non-sens du mutant *ninaD*<sup>P245</sup> (génotypage) avec les oligonucléotides présentés dans le tableau VII.

Génotype	FlyBase ID	Profil d'expression	Provenance
<b><i>Cg-GAL4</i></b>	FBst0007011	Corps gras	J. MONTAGNE (CNRS, Gif-sur-Yvette, France)
<b><i>CG8997-GAL4-GS</i></b>		Cellules épithéliales de l'intestin	H. TRICOIRE (CNRS, Paris, France)
<b><i>Delta-GAL4</i></b>	FBst0030139	Cellules souches intestinales	X. ZENG (NCI/Frederick, Etats-Unis)
<b><i>Dilp39-GAL4</i></b>		Cellules exprimant la <i>Dilp3</i>	J.A. VEENSTRA (CNRS, Bordeaux, France)
<b><i>Esg-GAL4</i></b>	FBti0166967	Cellules souches et entéroblastes	B.A. EDGAR (Heidelberg, Allemagne)
<b><i>Lsp2-GAL4</i></b>	FBti0018531	Corps gras	J. MONTAGNE (CNRS, Gif-sur-Yvette, France)
<b><i>Lsp2-GAL4-GS</i></b>		Corps gras	H. TRICOIRE (CNRS, Paris, France)
<b><i>Mex-GAL4</i></b>	FBtp0112739	Cellules épithéliales de l'intestin	G.H. THOMAS (Université de Pennsylvanie, PA, Etats-Unis)
<b><i>Mex-GAL4-GS</i></b>		Cellules épithéliales de l'intestin	J.R. MARTIN (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) (313)
<b><i>MYO1A-GAL4</i></b>	FBtp0098092	Entérocytes	B.A. EDGAR (Heidelberg, Allemagne)
<b><i>ninaD-GAL4</i></b>	FBti0078084	Cellules exprimant <i>ninaD</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (USA)
<b><i>S<sub>1</sub>106-GAL4-GS</i></b>	FBti0153270	Cellules épithéliales de l'intestin et corps gras	

**Tableau V – Liste des lignées pilote *GAL4* et *GAL4-GS* utilisées.**

La colonne « Génotype » indique le nom de la lignée *GAL4* ou *GAL4-GS* utilisée. La colonne « FlyBase ID » indique le numéro d'identification de la lignée sur FlyBase. Toutefois, certaines lignées ne disposent pas de numéro d'identification car il s'agit de génotypes conçus par le laboratoire de provenance. La colonne « Profil d'expression » fournit des informations sur la location tissulaire ou cellulaire du promoteur *GAL4*. La colonne « Provenance » fournit des informations sur la source de la lignée. Les lignées en **vert** correspondent à celles qui ont été générées au laboratoire.

Génotype	FlyBase ID	NIG-Fly	VDRC	Provenance
<i>UAS-CG6296-RNAi</i>		NIG.6296R		National Institute of Genetics (Kyoto, Japon)
<i>UAS-Cyp4p2-RNAi</i>			VDRC:1498	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (Vienne, Autriche)
<i>UAS-Gar1-RNAi</i>			VDRC:100604	
<i>UAS-Gba1a-RNAi</i>			VDRC:14697	
<i>UAS-GstE5-RNAi</i>			VDRC:25270	
<i>UAS-GFP-S65T</i>	FBti0013277			Bloomington Stock Center (USA)
<i>UAS-jou<sup>8M</sup></i>				J.R. MARTIN (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) (313)
<i>pMUH-jou<sup>1M</sup></i>				
<i>UAS-mCD8-GFP</i>	FBtp0002652			F. ROUYER (CNRS, Gif-sur-Yvette, France)
<i>UAS-nls-GFP(4776)</i>	FBtp0001204			
<i>UAS-LysB-RNAi</i>		NIG.1179R		National Institute of Genetics (Kyoto, Japon)
<i>UAS-minifly-RNAi</i>			VDRC:109616	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (Vienne, Autriche)
<i>UAS-Nhp2-RNAi</i>			VDRC:35729	
<i>UAS-ninaD-EGFP</i>	FBtp0113571			R. BENTON (Lausanne, Suisse)
<i>UAS-ninaD-RNAi</i>		NIG.31783R		National Institute of Genetics (Kyoto, Japon)
<i>UAS-Nopp140-RNAi</i>		NIG.7421R-3		
<i>UAS-sno2</i>				J.R. MARTIN (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) (313)
<i>UAS-sno3</i>				
<i>UAS-sno2&amp;3</i>				

**Tableau VI – Liste des transgènes UAS utilisés.**

La colonne « Génotype » indique le nom de la lignée *UAS*. La colonne « FlyBase ID » indique le numéro d'identification de la lignée sur FlyBase. Les colonnes « NIG-fly » et « VDRC » communiquent le numéro d'identification de la lignée au « National Institute of Genetics » (NIG-Fly, Kyoto, Japon) ou au « Vienna *Drosophila* Resource Center » (VDRC, Vienne, Autriche), respectivement. La colonne « Provenance » fournit des informations sur la source de la lignée. Les lignées en



vert correspondent à celles qui ont été générées au laboratoire.

Gène	Amorce sens (5' - 3')	Amorce anti-sens (5' - 3')
<i>Wolbachia</i>	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	AAAATTAACGCTACTCCA
<i>jouvence</i>	AAAGCGTTAGATATTAAGCTG	TACTGTGGTTAGTACCTC
<i>ninaD</i>	CCAACAAAAGGCCTGGGTCT	CCGCCCCACATTACCTTC

**Tableau VII – Les séquences d’oligonucléotides pour les vérifications en PCR.**

La colonne « Gène » indique le nom officiel du gène. Les colonnes « Amorce sens » et « Amorce anti-sens » correspondent aux séquences d’amorces du gène correspondant.

Génotype	FlyBase ID	Provenance
<i>F4, ninaD<sup>P245</sup></i>		J.R. MARTIN (CNRS, Gif-sur-Yvette, France)
<i>GR4</i>		
<i>GR6</i>		
<i>ninaD<sup>P245</sup></i>	FBal0013001	D. VASILIAUSKAS (CNRS, Gif-sur-Yvette, France)

**Tableau VIII – Liste des autres lignées utilisées.**

La colonne « Génotype » indique le nom de la lignée utilisée. La colonne « FlyBase ID » indique le numéro d’identification de la lignée sur FlyBase. Toutefois, certaines lignées ne disposent pas de numéro d’identification car il s’agit de génotypes conçus par le laboratoire de provenance. La colonne « Provenance » fournit des informations sur la source de la lignée. Les lignées en vert correspondent à celles qui ont été générées au laboratoire.

## 2. Genèse de lignées transgéniques.

Pour exprimer l’ADN complémentaire (ADNc) des gènes *CG6296* et *Cyp4p2* sous le contrôle du promoteur *UAS*, des clones d’ADNc pour *CG6296* (Cat. #LP07116) et *Cyp4p2* (Cat. #GH21174) ont été obtenus de « *Drosophila* Genomics Resource Center » (DGRC, Indiana University Bloomington), placés dans le vecteur pOT2 « donneur ». Tout d’abord, la séquence codante du gène *CG6296* a été amplifiée à partir de l’ADNc en utilisant les amorces sens et anti-sens dans le tableau IX, dont les sites de reconnaissance BglIII et XbaI ont été incorporés dans les amorces PCR. En revanche, aucune amplification de la région codante du gène *Cyp4p2* n’a été nécessaire, car le plasmide a directement été coupé avec les enzymes de restrictions BglIII et XhoI libérant ainsi le gène d’intérêt. Les fragments d’ADNc et les produits de digestion ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur pJFRC-MUH « récepteur » linéarisé (*Addgene*, Cat. #26213) aux sites BglIII et XbaI pour *CG6296* ou aux sites BglIII et XhoI pour *Cyp4p2*. Les mouches transgéniques ont été générées par BestGenes

([www.thebestgene.com](http://www.thebestgene.com), USA) en utilisant des procédures standard. Les constructions plasmidiques ont alors été insérées dans le site VK27 situé à la position 89E11 sur le troisième chromosome. Par la suite, les lignées transgéniques *UAS-cDNA-CG6296* et *UAS-cDNA-Cyp4p2* ont subi le même traitement que les autres lignées. Elles ont été rétrocroisées au moins six fois avec le type sauvage (*Canton-S*), puis introduite dans le fond génétique mutant par des croisements génétiques standard.

Gène	Amorce sens (5' - 3') + site de clonage BglII	Amorce anti-sens (5' - 3') + site de clonage XbaI
<b>CG6296</b>	TTCACTTCAACGATGAGATTGAGATCT	TCTAGAGGACTTGCAATATTATTGA

**Tableau IX – Les séquences d’oligonucléotides pour la génération de transgènes.**

La colonne « Gène » indique le nom officiel du gène selon FlyBase. Les colonnes « Amorce sens » et « Amorce anti-sens » correspondent aux séquences d’amorces du gène correspondant. Les sites de clonage ont été inclus dans les séquences d’amorces PCR.

### 3. Expériences de longévité.

Après amplification des lignées, des femelles vierges *GAL4* ou *GAL4-GS* ont été récoltées et croisées avec des mâles transportant le transgène *UAS* respectifs. Toutes les lignées pilote utilisées pour la collecte des femelles vierges ont été répertoriées comme étant *Wolbachia* (-). Alors que tous les croisements ont été faits dans ce sens, les descendants sont dans ce cas *Wolbachia* (-) vu que la transmission se fait exclusivement par la mère. De plus, toutes les lignées utilisées ont été rétrocroisées au moins six fois dans le fond génétique approprié.

Les descendants des croisements ont été récoltés et autorisés à s'accoupler dans les tubes pendant trois jours. Les croisements et la descendance ont été conservés en tout temps à 25°C. Trois jours plus tard, les mâles ont été retirés et les femelles ont été placées par génotype dans des cages par groupe de 200 à 300 individus. Des cages en plexiglas (50 mm de diamètre, 100 mm d'hauteur) ont été utilisées pour les expériences de longévité. Le haut est recouvert d'un filet en maille, tandis que le bas est fermé par une boîte de Pétri contenant le milieu nutritif.

Pour les lignées avec un système *GAL4-GS*, le milieu nutritif a été supplémenté en RU486 directement. Soit 1 mL d'une solution stock à 25 mg.mL<sup>-1</sup> de RU486 a été directement ajouté au milieu nutritif des mouches pour une concentration finale de RU486 à 25 µg.mL<sup>-1</sup>. La nourriture, fournie dans des boîtes de Pétri, a été changée tous les deux jours, les mouches mortes ont été identifiées visuellement et le nombre de mouches mortes a été enregistré. Les mouches qui ne bougent pas, ne répondent pas à une quelconque stimulation mécanique et sont posées sur le côté ou le dos ont été jugées mortes. Les cages ont été remplacées après vingt jours, où les mouches ont été transférées sans anesthésie. Les courbes de survie des différentes populations ont été analysées à l'aide du logiciel statistique OASIS v.2.0 en ligne

(<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/>) (314). Des tests de log-rank ont été utilisés pour comparer la longévité entre les différents génotypes.

## 4. Analyse transcriptomique (Séquençage d'ARN).

L'étude transcriptomique a été réalisée par la plateforme de Séquençage à haut débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) à Gif-sur-Yvette (France) et l'analyse bio-informatique par la compagnie NOVOGENE (Pékin, Chine). Le séquençage d'ARN a été réalisé sur des tissus intestinaux de mouches femelles adultes de cinq jours en trois réplicas biologiques pour chaque génotype, soit trois groupes de quarante intestins disséqués avec une analyse transcriptomique pour chaque réplica.

### 4.1. Extraction des ARN totaux.

A cinq jours, les intestins moyens ont été disséqués dans du tampon phosphate salin (PBS) froid et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Après avoir collecté une quarantaine d'intestins par génotype, sans les tubules de Malpighi, le tube a été stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'extraction des ARN. L'extraction des ARN a été réalisée à l'aide du kit « SV Total RNA Isolation System » (*Promega*, Cat. #Z3100) en suivant le protocole défini par le fournisseur. Les tissus intestinaux sont homogénéisés dans du tampon de lyse par action mécanique. Le thiocyanate de guanidine (GTC) et le  $\beta$ -mercaptoéthanol, présents dans le tampon de lyse, agissent pour perturber les complexes nucléoprotéiques, permettant à l'ARN d'être libéré en solution et isolé sans protéine. De plus, le GTC permet aussi d'inactiver les ribonucléases (RNases) endogènes présentes dans les extraits cellulaires. Après élimination du lysat des protéines précipitées et des débris cellulaires par centrifugation, l'ARN est précipité avec de l'éthanol et adsorbé sur une matrice en silice par centrifugation. La désoxyribonucléase (DNase I) est ensuite appliquée directement sur la membrane de silice pour digérer l'ADN génomique contaminant. L'ARN total lié est ensuite purifié des sels contaminants, des protéines et des impuretés cellulaires par des étapes de lavage. Enfin, l'ARN total est élué de la membrane par l'ajout d'eau dépourvue de nucléases. Après extraction et purification, les ARN ont été quantifiés et leur pureté analysée. La concentration en ARN total obtenu a été mesurée par spectrophotométrie (*BioRad*) à 260 nm, où une unité d'absorbance ( $A_{260}$ ) équivaut à  $\approx 40 \mu\text{g}$  d'ARN simple brin par millilitre. Parallèlement, la pureté des échantillons a également été déterminée à partir des rapports d'absorbance. En effet, la pureté d'une solution d'ARN est considérée comme acceptable lorsque le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est compris entre 1,8 et 2,0 et celui de l' $A_{260}/A_{230}$  entre 2,0 et 2,2. A l'issue de cette technique, nous avons obtenu en moyenne environ  $5 \mu\text{g}$  d'ARN extraits d'intestins disséqués.

## 4.2. Traitement à la DNase et purification des ARN totaux.

Normalement, les ARN isolés avec le kit « SV Total RNA Isolation System » sont exempt d'ADN et de protéines contaminants. Par mesure de sécurité, tous les échantillons ont ainsi été traités pendant 35 cycles de PCR avec la *Taq* polymérase en suivant les instructions du fabricant (*Invitrogen*, Cat. #10342-020) : 95°C pendant 45 secondes ; 55 - 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes, avec une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits du PCR ont ensuite été analysés sur un gel d'agarose à 1,5% coloré au bromure d'éthidium (BET) pour détecter toutes éventuelles contaminations à l'ADN génomique. Si toutefois les échantillons présentent des impuretés, un traitement à la DNase est nécessaire.

Afin de digérer toutes traces d'ADN contaminants, une unité de « RQ1 RNase-Free DNase » (*Promega*, Cat. #M6101) a été utilisée pour traiter un microgramme d'ARN. Dans cette étude, la DNase utilisée est une endonucléase qui permet à la fois de dégrader les ADN simple et double brins. Les ARN ont alors été incubés à 37°C pendant 30 minutes maximum pour éviter d'altérer l'intégrité des ARN. La DNase a ensuite été inactivée à 65°C pendant 10 minutes après l'ajout de la solution stop (20 mM EGTA, pH 8.0).

Vu que le tampon de réaction de la DNase contient une concentration élevée de  $Mg^{2+}$  qui n'est pas tolérée dans les réactions d'amplification, l'ARN doit alors être purifié en réalisant une extraction standard phénol:chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les ARN sont ainsi isolés avec un mélange contenant du phénol et du chloroforme. Après centrifugation, les ARN se trouvent dans la phase aqueuse supérieure et les ADN devenant plus solubles sont dans la phase organique inférieure. Les ARN sont ensuite isolés par précipitation alcoolique en présence de 300 mM d'acétate de sodium (pH 5.2), puis repris dans de l'eau ultra-pure et dosé de nouveau par mesure de l'absorbance à 260 nm.

## 4.3. Préparation de la bibliothèque et séquençage de l'ARN.

La préparation de la bibliothèque et le séquençage ont été réalisés par la plateforme de séquençage à haut débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC, CNRS, Gif-sur-Yvette, France), alors que les analyses bio-informatiques ont été faites par la compagnie NOVOGENE (Pékin, Chine). Le séquençage a été effectué sur de l'ARN total extrait d'intestins de mouches contrôles et mutantes jeunes (5 jours), et traité à la DNase en triple exemplaire. La qualité et la quantité des ARN totaux extraits ont été de nouveau contrôlées avec le bioanalyseur 2100 (*Agilent Technologies*) et le fluorimètre Qubit 2.0 (*ThermoFischer*), respectivement. Seuls les extraits avec une valeur de l'intégrité de l'ARN (RIN) supérieure à 7 ont été traités pour le séquençage. Une fois cette étape franchie, des banques d'ADNc polyadénylés (poly(A)) ont été construites à partir d'ARN poly(A) simple brin en utilisant « TruSeq® stranded mRNA Library Prep kit » (*Illumina*). Les bibliothèques ont ensuite été regroupées en quantités équimolaires et séquencées sur un Illumina NextSeq® 500 (*Illumina*).

En résumé, les transcrits d'ARNm ont été purifiés de l'ensemble des ARN cellulaires en utilisant des

chaînes d'ADN poly(T) greffées (oligo-dT) sur des billes magnétiques. Après purification, l'ARNm est fragmenté de manière aléatoire en petits morceaux de 200 à 300 pb en utilisant des cations divalents à température élevée. Les fragments d'ARN clivés sont copiés dans l'ADNc du premier brin en utilisant la transcriptase inverse et des amorces aléatoires. Au cours de la synthèse du deuxième brin, l'hybride ADNc/ARN a été converti en ADNc double brin à l'aide de l'ADN polymérase I et de la RNase H, et des dUTP ont été incorporés dans le second brin d'ADNc, marquant efficacement le deuxième brin. Le brin marqué avec le dUTP n'a pas été amplifié, permettant le séquençage du brin spécifique. Des adaptateurs ont ensuite été ligaturés aux extrémités des fragments d'ADNc pour préparer l'ADNc double-brin à l'hybridation. Les fragments d'ADNc sont amplifiés par PCR et purifiés pour créer la bibliothèque finale de séquençage de l'ADNc. Les bibliothèques ont été indexées à l'aide d'un index à 6 pb, ce qui permet de regrouper et de séquencer plusieurs bibliothèques sur un séquenceur NextSeq® 500 (*Illumina*) à l'aide du kit TG NextSeq® 500/550 High Output (75 cycles) (*Illumina*). Avant la mise en commun et le séquençage, la qualité des bibliothèques a d'abord été évaluée sur un bioanalyseur 2100 (*Agilent Technologies*). Toutes les bibliothèques ont ensuite été regroupées dans un rapport équimolaire et séquencées. Le multiplexage de huit bibliothèques sur l'instrument NextSeqMC 500 a produit environ 50 millions de séquences d'extrémité unique de 50 pb par échantillon. Une fois générées, les données de séquence ont été démultiplexées et les fichiers en format Fastq générés à l'aide du logiciel de conversion Bcl2Fastq2 v.2.15.0 issus du séquenceur. Les lectures ont été cartographiées sur le génome de la *D. melanogaster* à l'aide de l'outil d'alignement TopHat2 2.1.1.

Les données brutes ont été analysées à l'aide de TrimGalore, qui utilise Cutadapt 1.9.1 pour couper les bases de faible qualité et les adaptateurs de séquençage *Illumina* à partir de l'extrémité 3' des lectures. Seules les lectures qui étaient de vingt nucléotides ou plus après le découpage ont été conservées pour une analyse plus approfondie. Les comptes de gènes ont été compilés à l'aide de l'outil HTSeq. Seuls les gènes qui avaient au moins dix lectures dans une bibliothèque donnée ont été utilisés dans l'analyse ultérieure. Les données brutes ont été soumises à une normalisation quantile à l'aide d'un logiciel d'analyse statistique R et les changements d'expression génique ont été déterminés à l'aide du logiciel DESeq2, en ayant fixé le taux de faux positifs estimé à 20%. Nous avons analysé des gènes dont l'expression était > 2 FPKM (Fragments Per Kilobase Million) et avec une valeur  $p < 0,05$ . Les gènes rapportés comme changeant de manière significative avaient des niveaux d'expression au moins deux fois supérieurs ou inférieurs. Une analyse d'enrichissement des ensembles de gènes a été réalisée pour identifier les voies et les termes d'ontologie génétiquement différenciés pour chacune des comparaisons effectuées. Ces données sont disponibles sur NCBI sous l'accession PRJNA594829 (313).

## 5. Validation des données issues de l'analyse transcriptomique par qRT-PCR.

Les données issues de l'analyse transcriptomique ont été confirmées en partie par une méthode indépendante, sur une série d'échantillons indépendants. Les échantillons utilisés pour la validation ont été produits de la même façon que ceux initialement utilisés pour le séquençage d'ARN. Cependant dans certaines conditions, des groupes de trente femelles ont aussi été congelés à -80°C afin d'extraire l'ARN du corps entier de nos groupes de femelles. Après extraction, nous pouvons obtenir en moyenne environ 5 µg d'ARN extraits d'intestins disséqués ou jusqu'à environ 40 µg d'ARN extraits de corps entiers de mouche. Des réactions de polymérisation en chaîne quantitative à transcription inverse (qRT-PCR) ont été menées sur ≈ 2% des candidats les plus fortement dérégulés de chaque liste de gènes.

### 5.1. Transcription inverse.

L'ADNc a été transcrit à partir d'un microgramme d'ARN total pur avec la transcriptase inverse M-MLV (*Invitrogen*, Cat. #28025-013) et en présence de l'amorce oligo(dT) (*Promega*, Cat. #C1101). Le mélange réactionnel a ensuite été incubé à 37°C pendant 50 minutes, suivi de 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. L'amplification de certaines cibles de PCR nécessite l'élimination de l'ARN complémentaire de l'ADNc. Pour l'éliminer, deux unités de RNase H (*Invitrogen*, Cat. #18021071) sont ajoutées à la solution et incubée à 37°C pendant 20 minutes. L'ADNc peut maintenant être utilisé comme matrice pour l'amplification en qPCR.

### 5.2. PCR quantitative.

Les réactions de qPCR ont été exécutées sur une machine CFX96 (*BioRad*) équipée d'un thermocycleur C1000 et du logiciel *BioRad* CFX Manager v2.0. Le mélange réactionnel a été préparé avec la solution SYBR Green LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (*Roche*, Cat. #03752186001) en utilisant 5 microlitres de solution d'ADNc dans un volume réactionnel final de 20 microlitres. Le programme du thermocycleur est le suivant : (1) 2 minutes à 95°C ; (2) 40 cycles composés de 15 secondes à 95°C, 15 secondes entre 55 et 60°C et 1 minute à 72°C. La température d'hybridation ( $T_m$ ) a été adaptée pour chacune des réactions de qPCR. Préalablement, les amorces conçues pour l'étude ont subi certains contrôles pour évaluer et confirmer leur spécificité au gène d'intérêt. En effet, la taille des fragments obtenus au terme de différentes réactions de PCR sur de l'ADN génomique et/ou complémentaire a été visualisée après migration par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,5% coloré au BET. Le tableau X présente les séquences des amorces utilisées. Les données ont ensuite été analysées selon la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec le gène  $\alpha$ -*Tub84B* (315) comme référence interne à chaque

échantillon.

Au cours de l'étude, des qRT-PCR ont été effectués sur d'autres gènes que ceux issus de l'analyse transcriptomique.

Gène	Amorce sens (5' - 3')	Amorce anti-sens (5' - 3')	Source
<b><i>α-Tub84B</i></b>	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	AGCAGGCGTTTCCAATCTG	Ling and al. (2011) (315)
<b><i>Cyp4p1</i></b>	CAAGGGGCTCGTCTACAAC	ATGTCCGAGTGAGCATCTTG	-
<b><i>Dilp3</i></b>	GCAATGACCAAGAGAACTTTGGA	GCAGGGAACGGTCTTCGA	O'Brien and al. (2011) (274)
<b><i>FAS</i></b>	CGTACGACCCCTCTGTTGAT	AGTGCAAGTTACCGGGAATG	Song and al. (2014) (316)
<b><i>FATP</i></b>	TACATCTACACCTCCGGCAC	GGGCGGTAGAAAGATGTCCT	-
<b><i>FOXO</i></b>	AGGCGCAGCCGAATAGACGAATTTA	TGCTGTTGACCAGGTTTCGTGTTGA	Song and al. (2014) (316)
<b><i>GFP</i></b>	TGGAAGCGTTCAACTAGCAG	AAGGGCAGATTGTGTGGACA	-
<b><i>InR</i></b>	ACAAAATGTAAAACCTTGCAAATCC	GCAGGAAGCCCTCGATGA	Song and al. (2014) (316)
<b><i>lip4</i></b>	TTGCAACAGGATCGCTAGACC	GGCGTAATGCAAAAATTCGT	-
<b><i>MAGRO</i></b>	ACACCGAACTGATTCCGAAC	ATCCACCATTGGCAAACATT	Song and al. (2014) (316)
<b><i>MalA1</i></b>	AACTACTACGCCGATCCAG	GTAACCAGGTGTGATCGGC	-
<b><i>MalA3</i></b>	CTCTGCGTGATGAGCCTACT	CAGTTGCGTGGTTATGGAGG	-
<b><i>mth18</i></b>	GCTTATCTCACGCTCCACAA	CACGGCTACCAGTACGATG	-
<b><i>MTTP</i></b>	GTFATCTCAATGGCAAGGT	GTGGGTGATGCTGAAATCCT	Song and al. (2014) (316)
<b><i>RpL37a</i></b>	CTCCTCCTACCACATCCAGA	CAACCTTCAGGTGCTGCATG	-

**Tableau X – Les séquences des amorces utilisées pour les qPCR.**

La colonne « Gène » indique le nom officiel du gène selon FlyBase. Les colonnes « Amorce sens » et « Amorce anti-sens » correspondent aux séquences d'amorces du gène correspondant. La colonne « Provenance » donne des informations sur l'origine des paires d'oligonucléotides utilisées. Si aucune référence n'est fournie, cela signifie qu'elles ont été désignées au laboratoire. Les séquences d'amorces surlignées en **vert** (*α-Tub84B*) correspondent à celles du gène de ménage utilisé pour toutes les qPCR et avec lequel les résultats ont été normalisés.

## 6. Homéostasie cellulaire de l'épithélium intestinal.

Grâce à une combinaison de marqueurs moléculaires et de lignées cellulaires, nous avons pu évaluer la distribution ainsi que le dynamisme des différents types cellulaires de l'intestin. Ces différentes méthodes utilisées tout le long de cette thèse sont détaillées dans cette partie.

### 6.1. Dissection d'intestin de drosophile adulte.

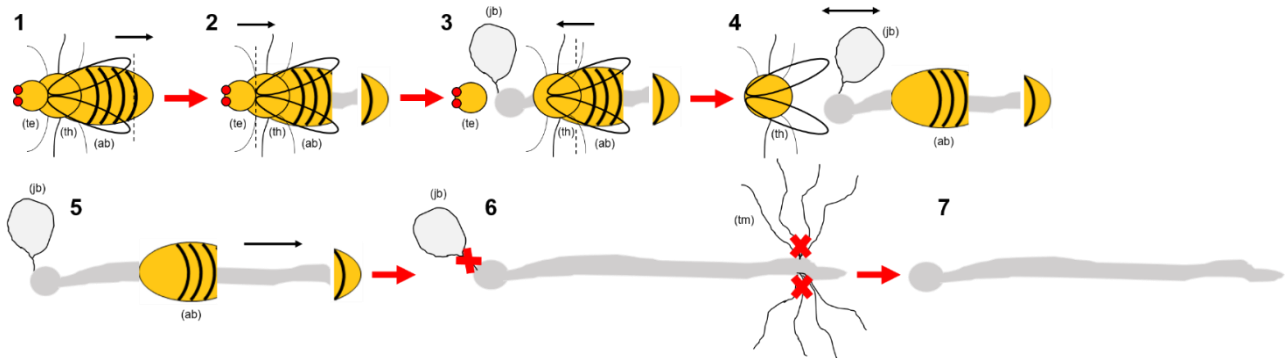
Pour ce type d'expérience, il est crucial d'obtenir un intestin intact allant du cardia jusqu'au pylore. A aucun moment, l'intestin moyen ne doit être touché directement avec les pinces, ce qui peut perforer ou déchirer le tissu. De plus, il est fortement déconseillé de tirer sur l'intestin pour l'isoler intégralement du thorax et de l'abdomen. Ceci peut entraîner une détérioration et une désorganisation cellulaire de l'épithélium de l'intestin, et ainsi fausser les résultats.

La procédure de dissection nécessite du matériel spécifique de précision, soit un microscope stéréoscopique avec grossissement (*SMZ660*, Nikon) équipé d'une source de lumière à LED avec des fibres optiques (*KL 1600 LED*, *SCHOTT*) et d'un « flypad » en teflon alimenté en CO<sub>2</sub> pour anesthésier et trier les mouches. De plus, il faut impérativement inspecter les pinces au microscope avant toute utilisation et s'assurer qu'elles sont bien droites et fines. La dissection commence au niveau de la partie postérieure de l'abdomen ventral et s'achève une fois que l'intégralité de l'intestin moyen a été isolée. Nous allons détailler ici les différentes étapes de la dissection d'un intestin de drosophile (Fig. 32) :

1. Saisir la mouche par les ailes et la transférer sur un verre de montre rempli de PBS. Il doit y avoir suffisamment de PBS pour que l'intestin reste immergé pendant la dissection. Pour plus de confort et de facilité, la mouche doit être positionnée sur le côté. A l'aide d'une paire de pinces, il faut saisir la cuticule au niveau du rectum et initier une petite déchirure, puis tirer légèrement pour rendre visible l'ampoule rectale.
2. Décapiter la mouche en effectuant une incision au niveau du cou et s'assurer que l'œsophage est complètement sectionné du cardia.
3. Séparez délicatement le thorax de l'abdomen en maintenant le thorax avec une pince tout en utilisant l'autre pour tirer délicatement au niveau de l'abdomen. Arrêtez-vous une fois que les deux sont séparés et que l'intestin est visible entre eux. Poursuivre en retirant soigneusement le muscle et la cuticule du thorax entourant la partie antérieure de l'intestin.
4. Il ne reste plus qu'à retirer la cuticule abdominale. Si l'intestin reste attaché dans le thorax ou dans l'abdomen, il faut localiser le jabot et le perforer à l'aide d'une pince, sans le retirer, pour éloigner doucement l'intestin.



- Enfin, séparer l'intestin de tout tissu restant. Cela inclura les ovaires, qui peuvent être facilement enlevés chez les femelles bien nourries en tirant doucement. Il est également conseillé d'éliminer le jabot et les tubules de Malpighi de leurs points d'attache avec l'intestin, à nouveau en tirant doucement dessus.



**Figure 32 - Processus de dissection de l'intestin d'une mouche adulte.**

Illustration des étapes majeures de dissection de l'intestin d'une mouche adulte. La dissection du tractus gastro-intestinal adulte se fait en cinq étapes. Tout d'abord, la tête est retirée (l'enlèvement des ailes est une étape facultative) suivie d'une séparation du thorax et de l'abdomen pour exposer l'intestin. L'intestin est ensuite libéré du reste du corps dans les étapes suivantes et séparé de tout tissu restant (ovaires, tubules de Malpighi, jabot). Les flèches noires indiquent la direction de traction. Les lignes en pointillées marquent la zone de rupture. Tête (te), thorax (th), abdomen (ab), jabot (jb), tubules de Malpighi (tm).

## 6.2. Quantification du nombre d'entérocytes.

La dissection d'intestins pour l'imagerie de fluorescence a été faite dans du PBS froid. Les tissus ont été fixés une heure dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) et 1% de glutaraldéhyde (v/v) (*Sigma-Aldrich*, Cat. # G6257). Après trois lavages au PBS, les préparations ont été recouvertes d'une solution DAPI (*Roche*, Cat. #10236276001) à  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. Les observations ont ensuite été faites sur un microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*), et les photos prises par une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). Les images des régions représentatives des intestins ont été saisies au grossissement 40X.

Pour déterminer le nombre d'EC, nous avons compté le nombre total de noyaux marqués au DAPI dans une région définie de l'intestin moyen par surface en utilisant le logiciel ImageJ à partir des images acquises. Les caractéristiques physiques de l'intestin moyen de drosophile décrites dans (260), (261) et (317) ont été utilisées pour identifier les régions de l'intestin moyen. Nous avons décidé de quantifier le nombre d'EC dans la R4, une région postérieure de l'intestin moyen située après la zone des cellules de cuivre (« Copper cells ») localisées dans la R3. Des images de la R4 de  $33\,000 \mu\text{m}^2$  de l'intestin moyen de mouches jeunes et vieilles ont ainsi été acquises. Nous avons compté manuellement tous les EC dans un champ couvert par un objectif 40X à un zoom 3X. Pour chaque intestin quantifié, deux zones de  $33\,000 \mu\text{m}^2$  dans la R4 ont été moyennées. Les

données ont été recueillies à partir de plusieurs intestins par génotype, et sont présentées sous la forme du nombre moyen d'EC par  $\mu\text{m}^2$  de surface.

### **6.3. Marquage des autres types cellulaires de l'intestin.**

Pour examiner la population de CSI et ainsi étudier le dynamisme de l'intestin au stade adulte, nous avons utilisé des marqueurs des CSI et des EB. À partir d'une collection existante de lignées d'insertion « enhancer-trap » de drosophile, nous avons identifié des lignées GAL4 qui sont exprimées de manière spécifique dans ces types cellulaires. Parmi celles-ci, on trouve des lignées pilote GAL4 insérés dans le locus Delta, un ligand de Notch, et Escargot (*Esg*), qui code un membre de la famille des facteurs de transcription Snail. Il a déjà été démontré qu'*Esg* est exprimée dans les CSI et leurs cellules progénitrices filles (EB) adultes (14), alors que *Delta* est exprimé uniquement dans les CSI adultes (15). Lorsqu'elles sont combinés à l'*UAS-nlsGFP*, les lignées transgéniques *Delta-GAL4>UAS-nlsGFP* ou *Esg-GAL4>UAS-nls-GFP* ont conduit l'expression de la *GFP* spécifiquement dans le noyau des CSI adultes ou à la fois dans les CSI et EB adultes, respectivement. Nous avons compté les CSI ou les groupes de CSI et d'EB adultes marqués par l'expression de la *GFP* dirigée par la lignée *Delta-GAL4* ou *Esg-GAL4* dans tout l'intestin moyen. Des intestins ont été disséqués de femelles adultes âgées de 7 à 40 jours pour chaque souche étudiée, fixés avec 4% de PFA pendant 30 minutes, lavés trois fois au PBS, puis montés dans du Mowiol. Les tissus ont été analysés au microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*) et imagés avec la caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). Le nombre total de CSI ou de CSI/EB (*GFP<sup>+</sup>*) dans l'intestin moyen a été compté en utilisant le logiciel ImageJ à partir des images acquises.

### **6.4. Evaluation de l'activité proliférative des cellules souches intestinales.**

#### **6.4.1. Etude de la division cellulaire.**

Des intestins adultes ont été disséqués dans du PBS et fixés pendant une heure à 4°C avec 4% de PFA. Les tissus ont été lavés dans une solution tampon anticorps (0,5% de BSA et 0,1% Triton™ X-100 dans PBS) trois fois pendant au moins 10 minutes, suivis d'une incubation pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire polyclonal anti-phospho-histone H3 (pH3) de lapin (1:2000, *Millipore*, Cat. #06570), lavés à nouveau avec la solution tampon anticorps, et incubés pendant une heure avec l'anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa 488 (1:400, *Invitrogen*, Cat. #A11304) à l'obscurité. Enfin, les noyaux ont été marqués au DAPI (1:200, *Roche*, Cat. #10236276001) dilué dans du PBS pendant 5 minutes. Les préparations ont été montées dans du Mowiol et examinées au microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*). Des images d'intestin

ont été acquises avec une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*).

L'anti-pH3 de lapin a été utilisé pour identifier les CSI en cours de mitose détectables à un moment donné. Les indices mitotiques ont été quantifiés en comptant le nombre total de cellules *pH3<sup>+</sup>* par intestin.

#### **6.4.2. Incorporation à l'EdU.**

Le taux de prolifération des CSI a été détecté à l'aide du kit « Click-iT<sup>®</sup> EdU Imaging kit » (*Invitrogen*, Cat. #C10086). Pour les tests de prolifération, les intestins ont été incubés à 25°C pendant une heure avec 20 µM d'EdU dans du PBS, immédiatement après la dissection. Les intestins ont ensuite été fixés avec 4% de PFA pendant 30 minutes et lavés trois fois pendant 10 minutes avec du tampon anticorps (PBS additionné de 0,5% de BSA et 0,1% Triton<sup>™</sup> X-100). L'incorporation de l'EdU dans l'intestin a été visualisée par la réaction de Click-iT selon les instructions du fabricant. En bref, un cocktail de réaction Click-iT<sup>®</sup> a fraîchement été préparé et a été ajouté aux tissus pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après incubation, les échantillons ont été lavés trois fois avec le tampon anticorps avant de colorer les noyaux au DAPI (1:200, *Roche*, Cat. #10236276001). Les intestins ont été observés sur un microscope à fluorescence Leica DM 600B (*Leica*) en utilisant le filtre optique adapté selon le fluorochrome choisi (Alexa 488, 594 ou 647) et les images ont été prises à l'aide d'une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). Le nombre de cellules *EdU<sup>+</sup>* a été compté dans l'intestin entier.

### **6.5. Détermination de la quantité d'ADN et de la taille des entérocytes.**

Pour évaluer l'endoréplication des EC, nous avons mesuré la teneur en ADN des EC (318). Des noyaux colorés au DAPI (section 6.2 de la partie « Matériels et Méthodes ») dans la R4 pour chaque génotype ont été imagés à l'aide d'un microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*) au grossissement 40X, équipé d'une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). La détermination du niveau d'ADN dans les EC est basée sur la quantification de l'intensité du signal de fluorescence du DAPI en utilisant le logiciel ImageJ. Tout d'abord, chaque noyau a été délimité manuellement à l'aide de l'outil « Freehand Selections ». Par la suite, l'outil de mesure a été réglé afin de pouvoir mesurer l'intensité de fluorescence du noyau à l'aide de la fonction de mesure de densité intégrée (**Fonction sur ImageJ** : Analyze > Set Measurements > Cocher « Integrated Density »). Le signal de tous les noyaux pour un génotype donné a été fusionné. Chaque point graphique correspond à la moyenne de dix noyaux dans une région de 33 000 µm<sup>2</sup> par intestin. En parallèle de ces mesures, la taille moyenne des EC a également été déterminée et effectuée à l'aide de la fonction de mesure de l'aire sur ImageJ (**Fonction sur ImageJ** : Analyze > Set Measurements > Cocher « Area »).

## **7. Analyse de la physiologie intestinale.**

### **7.1. Mesure de la longueur de l'intestin.**

Pour mesurer la longueur de l'intestin, des femelles adultes à différents âges par génotype ont été utilisées. Les intestins individuels fixés et colorés au DAPI, comme décrit dans la section 6.2 de la partie « Matériels et Méthodes », ont été visualisés et capturés à l'aide d'un microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*), couplé à une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). Les intestins entiers ont été imagés à l'objectif 10X puis recomposés automatiquement en mosaïque. La longueur de l'intestin a été déterminée par traçage à partir du centre du cardia le long de l'axe de l'intestin moyen jusqu'à la jonction intestin moyen/intestin postérieur, indiquée par la ramification des tubules de Malpighi (pylore), à l'aide de l'outil « Freehand Lines » sur ImageJ.

### **7.2. Marquage et comptage des muscles viscéraux exprimant le *Dilp3*.**

Pour marquer les cellules musculaires intestinales exprimant le *Dilp3*, la lignée *Dilp3-GAL4* appelée *Dilp39-GAL4*, établie par (270), a été utilisée pour diriger l'expression du transgène *UAS-GFP-S65T* dans ces cellules. Les progénitures femelles issues de ce croisement ont été collectées et vieilles à 25°C jusqu'à 7 jours. Pour visualiser le profil d'expression du *Dilp3* dans l'intestin de mouches adultes, des intestins ont été disséqués, fixés dans 4% de PFA pendant 30 minutes, rincés au moins trois fois dans du PBS et montés entre lame et lamelle dans du Mowiol. Les échantillons ont ensuite été analysés et imagés au microscope à fluorescence Leica DM 600B (*Leica*), équipé d'une caméra numérique Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). Pour toutes les combinaisons génétiques testées, nous avons procédé au comptage du nombre de fibres musculaires viscérales circulaires marquées à la GFP dans chaque région de l'intestin.

## **8. Etude de l'homéostasie métabolique.**

### **8.1. Quantification des paramètres métaboliques.**

Toutes les quantifications ont été menées sur des mouches individuelles femelles adultes âgées de 7 jours. Pour le dosage des niveaux des différents paramètres métaboliques, les animaux ont été préalablement pesés et rincés au moins trois fois au PBS pour retirer toutes traces de nourritures potentiellement présentes sur l'extérieur de la mouche. Pour la détermination du poids corporel, les mouches ont été brièvement

anesthésiées au CO<sub>2</sub> et pesées par groupe de 15 à 24 femelles adultes dans un tube Eppendorf sur une balance de précision. Ainsi, les niveaux des métabolites pour chaque échantillon ont été exprimés par rapport au poids corporel moyen d'une mouche (mg) et toutes les données sont présentées comme étant normalisées au niveau du type sauvage ou mutant fixé à 1, selon les conditions expérimentales.

### **8.1.1. Dosage du cholestérol.**

Le kit « Amplex® Red Cholesterol Assay kit » (*Invitrogen*, Cat. # A12216) a été utilisé pour mesurer à la fois les niveaux de cholestérol libre et d'esters de cholestérol. Les mouches ont été homogénéisées mécaniquement avec un mélange de chloroforme:isopropanol:NONIDET P40 (7:11:0,1) comme décrit dans (319). L'homogénat a été centrifugé à 13 000 g pendant 10 minutes et le surnageant récupéré a été évaporé au Speed-Vacuum (lyophilisateur) pendant deux heures à environ 50°C. Après évaporation, le culot a été repris dans le tampon de réaction (« 1X Reaction Buffer ») et la moitié de l'échantillon reconstitué a été mélangée à 0,5 µL d'estérase, puis mise dans un bain-marie pendant au moins 12 heures à 37°C. Après incubation, 30 microlitres de chaque réaction (avec et sans estérase) ont été transférés sur une plaque de 96 puits et le surnageant a été dosé selon les instructions du fabricant. Soit, 30 µL du mélange réactionnel ont été ajoutés aux réactions et le mélange a été incubé à 37°C pendant 45 minutes. La fluorescence a été mesurée avec le lecteur de microplaque GENios® Tecan™ (*Tecan*) avec un jeu de filtres de 535/590 nm. Une régression linéaire de la résorufine de 0 à 50 µg.mL<sup>-1</sup> a été utilisée pour déterminer la concentration des échantillons.

### **8.1.2. Dosage du glucose.**

Les niveaux de glucose ont été déterminés par l'utilisation du test « Glucose Assay kit » (*Sigma-Aldrich*, Cat. #GAGO-20). Brièvement, les mouches ont été broyées dans du PBS glacé sur la glace. Il est important que les échantillons de tissus homogénéisés soient conservés sur de la glace afin d'empêcher la dégradation des autres formes de glucides présents dans les extraits en glucose libre par des enzymes endogènes. En parallèle, quelques microlitres d'homogénats ont été récupérés pour le dosage des protéines. Les échantillons ont ensuite été chauffés pendant 10 minutes à 70°C pour inactiver toutes les enzymes et centrifugés 3 minutes à la vitesse maximale (20 000 g) à 4°C. Conformément aux recommandations du fournisseur, 30 µL de surnageant ont été aliquotés dans des plaques à puits multiples et ajoutés aux 100 µL de réactif « Glucose Assay Reagent ». Les préparations ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C et les réactions ont ensuite été stoppées avec 100 µL d'acide sulfurique (12N). L'absorbance a été lue à 550 nm avec un lecteur de plaque GENios® Tecan™ (*Tecan*).

### 8.1.3. Dosage des protéines.

Le dosage des niveaux protéiques a été effectué par une méthode colorimétrique en utilisant le Bleu de Coomassie (« Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay », *Thermo Fischer*, Cat. #B6916) basée sur la formation d'un complexe entre le Bleu de Coomassie G-250 et les protéines en solution (méthode de Bradford). Les surnageants récupérés des différents tests de dosage ont été centrifugés à 1 000 g pendant 2 minutes pour enlever les débris cellulaires. A partir de là, 2 µL d'extrait dilué dans 18 µL de diluant (selon l'origine de l'homogénat) ont été ajoutés aux 200 µL de réactif de Bradford. La plaque a ensuite été incubée 30 minutes à 37°C et l'absorbance a été enregistrée à 590 nm avec un lecteur de plaque GENios® Tecan™ (*Tecan*).

### 8.1.4. Dosage du tréhalose.

Le tréhalose est un glucide diholoside non-réducteur et résistant jusqu'à 100°C. Il a été quantifié par un dosage enzymatique qui est basé sur le protocole de mesure du niveau de glucose. La différence est que la tréhalase a été ajoutée à l'extrait afin de digérer le tréhalose en glucose libre, qui a ensuite pu être quantifié par des dosages standard et par rapport au niveau de glucose présent dans l'échantillon d'origine grâce au test « Glucose Assay kit » (*Sigma-Aldrich*, Cat. #GAGO-20). Les mouches ont d'abord été homogénéisées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL dans du carbonate de sodium (0.25M) au broyeur électrique sur de la glace. Après avoir récupéré quelques microlitres d'extrait pour le dosage des protéines, les homogénats ont été incubés pendant deux heures à 95°C et refroidis à 4°C. Cette étape a pour but de détruire les sucres autres que le tréhalose. De l'acide acétique (1N) et de l'acétate de sodium (0.25 M, pH 5.2) ont ensuite été ajoutés au mélange. Après centrifugation (10 minutes à 12 000 rpm), le surnageant récupéré a été incubé avec 2 µL de tréhalase porcine (*Sigma-Aldrich*, Cat. #T-8778) et les tubes ont été placés toute une nuit à 37°C. A cette étape, le tréhalose a été converti en glucose après incubation. Le glucose total a ainsi été mesuré en ajoutant 50 µL de réactif « Assay Reagent » aux 25 µL d'extrait dans des plaques à puits multiples et mis à incuber pendant 30 minutes à 37°C, selon les instructions du fabricant. Au bout d'une demi-heure d'incubation, la réaction a immédiatement été stoppée en additionnant 50 µL d'acide sulfurique (12N). Cette solution passe de la couleur marron à la couleur rose dont l'intensité varie en fonction de la quantité de glucose présente. Les quantifications ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de plaques GENios® Tecan™ (*Tecan*) à 550 nm.

### 8.1.5. Dosage des triglycérides.

Les TG ont été quantifiés par une méthode colorimétrique et enzymatique à l'aide du kit « LiquiColor TG kit » (*Stanbio*, Cat. #2200-430). Pour ce dosage, les mouches ont préalablement été décapitées car la présence du pigment oculaire dans les échantillons pourrait interférer avec la précision des mesures

d'absorbance à certaines longueurs d'onde. Pour une quantification des TG, les mouches ont été homogénéisées avec du PBST (0,05% de Tween20 dans du PBS) sur de la glace. Cela a permis de réduire considérablement les erreurs car sinon les glycérolipides des mouches seront dégradés enzymatiquement en glycérol libre par des enzymes endogènes et fausseraient l'analyse finale. Avant de poursuivre l'expérimentation, quelques microlitres d'extrait ont été récupérés pour le dosage des protéines. Les homogénats ont ensuite été chauffés à 70°C pendant 10 minutes pour inactiver les enzymes endogènes, et les débris cellulaires ont été éliminés par une brève centrifugation. Pour mesurer les niveaux de TG, 20 µL du surnageant résultant ont été combinés avec 80 µL de réactif « Enzymatic TG Reagent » et incubés pendant 5 minutes à 37°C, conformément aux instructions du fabricant. L'OD<sub>492</sub> a été mesuré avec un lecteur de plaque GENios® Tecan™ (*Tecan*) et comparé à une courbe de standardisation.

## **8.2. Visualisation des lipides dans l'intestin.**

### **8.2.1. Coloration des gouttelettes lipidiques.**

Pour la coloration des gouttelettes de lipides dans l'intestin adulte, des intestins de femelles de 7 jours ont été disséqués dans du PBS et fixés avec 4% de PFA et 1% de glutaraldéhyde pendant 30 minutes à température ambiante. Après fixation, les tissus ont été rincés deux fois pendant 5 minutes chacun avec du PBST (PBS auquel a été ajouté 0,05% de Tween20). Une solution stock de Nile Red à 10% (*Sigma-Aldrich*, Cat. #72485) a été préparée dans du DMSO et les échantillons ont été incubés dans du Nile Red à 0,05% fraîchement préparé avec du PBST pendant 30 minutes dans l'obscurité. Ensuite, les tissus ont été rincés deux fois avec du PBST et montés au Mowiol. Les intestins ont été imagés sur un microscope fluorescent *Leica DM 600B* (*Leica*) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 543 nm et un spectre d'émission de 600 - 650 nm, et les images ont été acquises à l'aide de la caméra digitale *Hamamatsu C10600 ORCA-R2* (*Leica*).

### **8.2.2. Marquage des lipides neutres.**

Pour la visualisation des lipides neutres, des mouches femelles adultes matures de 7 jours ont été disséquées pour exposer l'intestin et fixés pendant 30 minutes dans 4 % de PFA. Les échantillons ont été lavés au PBS additionné de 0,05% de Tween20 (PBST) et perméabilisés dans 50% d'isopropanol et 50% de PBST pendant 2 minutes. Une solution stock d'Oil-Red-O (ORO) à 0,1% (*Sigma-Aldrich*, Cat. #O0625-25G) a été préparée dans de l'isopropanol. Les tissus ont ensuite été incubés dans une solution d'ORO (3 parts de solution d'ORO à 0,1% et 2 parts de PBST) pendant 30 minutes, lavés une fois avec 50% d'isopropanol/50% de PBST pendant 2 minutes, puis deux fois avec du PBST pendant 5 minutes, et montés dans du Mowiol pour l'imagerie.

Les intestins ont été observés et photographiés à l'aide du microscope *Leica DM 600B (Leica)*, couplé à une caméra numérique *DFC450 (Leica)*.

### **8.3. Visualisation de la distribution du cholestérol non-estérifié dans les membranes cellulaires.**

Pour les expériences de coloration à la filipine sur des tissus intestinaux, des femelles adultes âgées de 7 jours ont été utilisées. Les intestins ont été disséqués dans du PBS et fixés dans de la PFA à 4% pendant 30 minutes. Après fixation, les tissus ont été lavés au moins trois fois avec du PBST (PBS supplémenté de 0,05% de Tween20). Une solution mère fraîche de filipine à 2 mg.mL<sup>-1</sup> (*Sigma-Aldrich*, Cat. #F4767-1MG) a été reconstituée dans de l'éthanol absolu. Les échantillons ont ensuite été colorés avec 50 µg.mL<sup>-1</sup> de filipine dans du PBST pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité, puis trois lavages au PBST pendant 10 minutes. Après la coloration, les intestins ont directement été montés dans du Mowiol. Les tissus colorés ont été immédiatement analysés au microscope fluorescent *Leica DM 600B (Leica)* en utilisant une longueur d'onde excitatrice de 360 - 480 nm. Des images ont été prises avec la caméra digitale *Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (Leica)*.

## **9. Détermination du profil d'expression de *ninaD*.**

### **9.1. Localisation cellulaire.**

Des progénitures issues du croisement entre les mouches *UAS-GFP-S65T* et les mouches *ninaD-GAL4* (320) ont été élevées à 25°C pendant au moins 7 jours et utilisées pour réaliser des coupes histologiques au cryostat sur mouches entières afin de déterminer la localisation cellulaire du gène *ninaD*. Pour les sections au cryostat, des femelles adultes ont été encastrées dans 20% de carboxyméthylcellulose, congelées dans de l'azote liquide et cryosectionnées à 30 µm d'épaisseur. Les coupes ont ensuite été fixées rapidement dans de la PFA à 4% pendant 15 minutes, lavées trois fois avec du PBS, et montées au Mowiol pour l'imagerie. Les lames ont directement été observées au microscope à fluorescence *Leica DM 600B (Leica)*, et des images ont été prises avec la caméra digitale *Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (Leica)*.

### **9.2. Localisation subcellulaire.**

Pour effectuer l'analyse du profil d'expression génétique de *ninaD* dans l'intestin, la lignée transgénique *UAS-ninaD-EGFP* (321) a été croisée soit avec la lignée pilote *Mex-GAL4*, soit avec la *MYO1A-*



*GAL4* afin de diriger l'expression du transgène *UAS* dans les cellules épithéliales intestinales et ainsi déterminer la localisation subcellulaire de *ninaD* dans ce tissu. Pour cela, des intestins ont été disséqués à partir de mouches de 7 jours et fixés avec 4% de PFA et 1% de glutaraldéhyde pendant 30 minutes. Après une série de lavage au PBS, une contre-coloration au DAPI (1:200, *Roche*, Cat. #10236276001) a aussi été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules épithéliales. La fluorescence de la *GFP* et du DAPI ont été examinées au microscope fluorescent *Leica DM 600B (Leica)*, et des images ont été prises avec une caméra *Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (Leica)*.

## **10. Evaluation de la neurodégénérescence.**

### **10.1. Histologie des cerveaux.**

Les mouches ont été collectées et vieilles à 25°C jusqu'à 40 jours. Les têtes des mouches ont été isolées sur des collards et fixées dans une solution fixatrice de Carnoy fraîche (éthanol:chloroforme:acide acétique à 30:15:5) (322) pendant quatre heures à température ambiante. Les têtes ont été déshydratées dans une série d'éthanol absolu et placées dans du méthylbenzoate pendant une nuit. Le lendemain, les tissus ont été incorporés dans de la paraffine selon des procédures histologiques standard (sept bains successifs d'une heure chacun). Des sections de 7 µm d'épaisseur ont été découpées au microtome, recueillies sur des lames en verre et séchées sur une plaque chauffante. Les coupes sont ensuite déparaffinées dans deux bains successifs de xylène pendant 30 minutes chacun à environ 60°C, suivis de quatre bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (95%, 90%, 70%, 50%) de 15 minutes chacun. Par la suite, les coupes ont été colorées dans 1% de Bleu de Toluidine (*Sigma-Aldrich*, Cat. #89640-5G) et 1% de borate pendant 8 minutes, puis rincées à l'eau. Les sections ont été brièvement séchées à l'air libre avant d'être montées avec du Mowiol et une lamelle de recouvrement. Les sections ont été examinées sur un microscope optique *Leica DM 600B (Leica)*, équipé d'une caméra *DFC450 (Leica)*. Des images numériques ont été prises des sections frontales de la tête entière, qui contenait à la fois la rétine et le cerveau.

### **10.2. Méthode de quantification des lésions vacuolaires.**

La neurodégénérescence est indiquée par l'apparition de lésions vacuolaires dans le cerveau central. Les séries de coupes prises au microscope optique en lumière diascopique au grossissement 40X ont été enregistrées en niveau de gris et chargées dans le logiciel ImageJ. Le nombre de lésions vacuolaires a été déterminé sur la surface d'un demi-cerveau, sans prendre en compte les lobes optiques. Les images ont été converties en 32 bits et un seuil minimum a été appliqué à l'ensemble de l'image (**Fonction sur ImageJ :**

Image > Adjust > Threshold). Chaque demi-cerveau a été délimité manuellement à l'aide de l'outil « Free-hand Selections » et la surface de comptage a été mesurée ( $\mu\text{m}^2$ ) (**Fonction sur ImageJ** : Analyze > Set Measurements > Cocher « Area »). La zone délimitée a ensuite été quantifiée dans le cerveau et des paramètres sur la taille des vacuoles ont été fixés (**Fonction sur ImageJ** : Analyze > Analyze Particles), afin d'estimer le nombre de lésions vacuolaires. Nous avons normalisé le nombre de vacuoles pour chaque cerveau en fonction de la surface de comptage.

## 11. Préparation de la sonde d'ARN et hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* a été réalisée en utilisation des sondes d'ARN, qui sont de simples brins d'ARN résultant de la transcription *in vitro* d'un morceau d'ADNc cloné dans un plasmide bactérien. Pour la construction de la sonde, la région codante pour *jouvence* a été amplifiée avec les amorces sens et anti-sens suivantes : 5' - AAAGCGTTAGATATTAAGCTG - 3' et 5' - TACTGTGGTTAGTACCTC - 3'. Le produit de PCR du snoARN *jouvence* (fragment de 148 pb) a été sous-cloné dans le vecteur pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-TA (*Invitrogen*, Cat. #K465001). L'ADN plasmidique a ensuite été linéarisé au moyen des enzymes de restriction *XhoI* ou *KpnI* (*Promega*) en aval de l'insert cloné, puis purifié à l'aide du kit « NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid » (*Macherey-Nagel*, Cat. #740588.50) et quantifié. La sonde anti-sens a été transcrite en utilisant l'ARN polymérase SP6, alors que la sonde sens a été synthétisée par l'ARN polymérase T7. Les matrices des sondes ont été marquées à la digoxygénine (DIG) à l'aide du kit « DIG RNA Labelling (SP6/T7) » (*Roche*, Cat. #11175025910), conformément aux instructions du fabricant, en utilisant 1 mg de l'ADN linéarisé de façon à ajouter un dUTP couplé à la DIG tous les 20 à 25 nucléotides.

Des intestins de femelles adultes de 7 jours ont été disséqués dans du PBS et fixés dans une solution de PFA à 4% pendant une heure à 4°C. Les tissus sont rincés au moins trois fois pendant 5 minutes avec du PBS auquel est ajouté 0,1% de Tween20 (PBST), suivi d'une digestion à la protéinase K (Cat. #P2308) à 10  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  dans du PBST pendant 5 minutes. La réaction est ensuite stoppée par deux rinçages de 5 minutes avec de la glycine à 2  $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$  et les intestins subissent à nouveau trois lavages de 5 minutes au PBST. Par la suite, les tissus sont refixés avec la PFA 4% pendant 20 minutes, puis s'enchaînent trois lavages de 5 minutes avec du PBST et une fois pendant 3 minutes avec une solution PBST/tampon d'hybridation (1:1). Le tampon d'hybridation est constitué de 50% de formamide déionisé (*Sigma-Aldrich*, Cat. #47671), 5X de citrate de sodium (soit 3M de NaCl et 300 mM de citrate de sodium dihydrate, pH = 7.0), 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  d'ADN de sperme de saumon soniqué extrait au phénol (Cat. # S3126), 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  d'héparine (*Sigma-Aldrich*, Cat. #H4784), 1% de Tween20 et 50X de Denhard. Après les diverses étapes de lavage, les tissus sont incubés une heure à 65°C dans le tampon d'hybridation dans un incubateur, puis 12 heures à 45°C soit avec la sonde anti-sens marquée à la DIG (sonde diluée à 1% dans le tampon d'hybridation) soit avec la sonde sens couplée à la DIG pour effectuer les expé-

riences témoins. Le lendemain, les préparations sont lavées une fois 15 minutes à 45°C avec le tampon d'hybridation et quatre fois 15 minutes à 45°C avec une solution de tampon d'hybridation/PBST aux ratios suivants : 3:0, puis 3:1, 1:1 et enfin 1:3. Les tissus sont ensuite lavés trois fois pendant 5 minutes avec une solution de PBST à température ambiante afin d'éliminer toutes les sondes résiduels non-hybridés.

Les tissus sont ensuite incubés pendant une heure à température ambiante avec une solution de blocage, soit du PBST auquel est ajouté 10% de « goat serum ». Pour la détection de la DIG et sans effectuer de lavage, les échantillons sont incubés une heure à température ambiante avec un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline de souris (1:500, *Perkin Elmer*, Cat. #NEF832001EA). Après quatre rinçages de 5 minutes dans du PBST, le signal a été révélé grâce à l'utilisation du kit « TSA™ Plus Cyanine 3 » (Tyramide Signal Amplification) (*Perkin Elmer*, Cat. #NEF744E001KT). Conformément aux instructions du fabricant, les intestins ont alors été incubés pendant 5 minutes avec le réactif d'amplification de tyramide marqué à la Cyanine 3 dilué au 1:500 dans le diluant d'amplification fourni par le kit, et rincés trois fois au PBST pendant 5 minutes. Une contre-coloration au DAPI (1:200, *Roche*, Cat. #10236276001) est réalisée. Les préparations sont ensuite observées après montage entre lame et lamelle dans du Mowiol au microscope fluorescent Leica DM 600B (*Leica*), couplé à une caméra digitale Hamamatsu C10600 ORCA-R2 (*Leica*). A partir des séries d'images obtenues, la taille des noyaux et des nucléoles pour chaque génotype ont été déterminées à l'aide du logiciel ImageJ comme décrit dans la section 6.5 de la partie « Matériels et Méthodes ».

## 12. Analyses statistiques et présentations des données.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism v.5. Les valeurs moyennes ont été comparées à l'aide du test de Student non-paramétrique entre deux groupes ou à l'aide du test ANOVA unidirectionnelle avec correction de Bonferroni entre plus de deux groupes. Tous les résultats ont été jugés significatifs lorsque  $p < 0,05$  et les niveaux de significativité ont été présentés dans les figures de la manière suivante : \* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ . Toutes les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M. : Standard Error of the Mean). Toutes les images appartenant à la même expérience pour les mesures de densité de fluorescence ont été acquises en utilisant exactement les mêmes paramètres.

# RÉSULTATS

## Chapitre 1 : Le rôle de *jouvence* sur l'homéostasie cellulaire de l'épithélium intestinal.

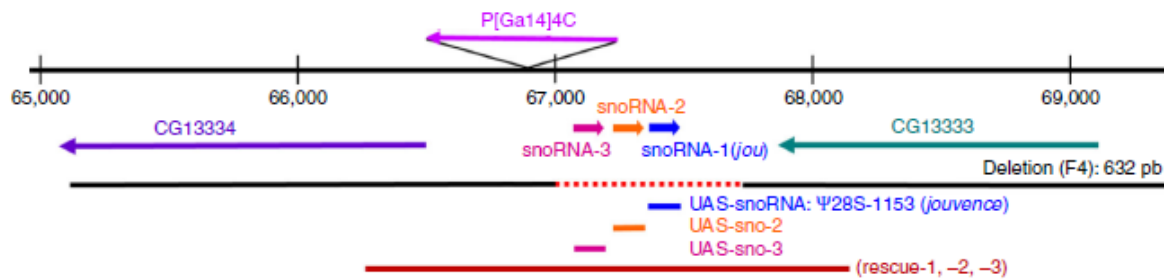
### 1. Introduction.

#### 1.1. Préambule.

Avant de démarrer ma thèse, l'équipe de Jean-René MARTIN a identifié et caractérisé un petit ARN nucléolaire (snoARN) dans l'épithélium intestinal de la drosophile et remplissant une fonction majeure dans la longévité. Dans une étude visant à caractériser les gènes impliqués dans l'activité locomotrice et plus particulièrement ceux exprimés dans le complexe central (299), un centre pré-moteur dans le cerveau, une mutagenèse insertionnelle par mobilisation d'un élément P modifié a été réalisée. Une lignée « enhancer-trap » P[GAL4]4C a ainsi été identifiée. Ils ont notamment montré que le blocage spécifique de la transmission synaptique établie par les neurones du corps ellipsoïde de la drosophile, une sous-structure du complexe central dans le cerveau, entraîne une diminution significative de l'activité locomotrice chez les mâles et les femelles (300). Cependant, dans une étape plus avancée et dans un contexte d'étude sur le vieillissement, la lignée P[GAL4]4C a été moléculairement et génétiquement caractérisée dans le but d'étudier si certains gènes avoisinant l'insertion de l'élément P s'expriment spécifiquement dans ces structures cérébrales et d'étudier si ces gènes ont un effet sur les performances sensori-motrices au cours du vieillissement. Les résultats ont révélé que le transposon P[GAL4]4C est inséré sur le second chromosome à la position 50B1 entre les gènes putatifs CG1333 (*link*) et CG13334 (Fig. 33). De plus, une étude bio-informatique a annoté un nouveau snoARN (*Ψ285-1153*) de 148 pb dans le locus près de l'insertion du P[GAL4] (Fig. 33) (323). Plus tard, une analyse transcriptomique a annoté deux autres snoARN, *sno2* (2R:9445205) et *sno3* (2R:9445410), localisés juste en amont du premier snoARN (*sno1*) (Fig. 33) (<http://flybase.org>). Comme précisé plus haut, deux types de snoARN canoniques sont distingués : après une analyse bio-informatique, le *sno1* présente une structure secondaire en forme de double épingle à cheveux avec une zone non appariée en hélice dans chaque épingle, caractéristique des snoARN de type H/ACA. Il serait alors responsable, entre autre, de la pseudouridylation des ARNr. Cependant, les deux autres snoARN (*sno2* et *sno3*) récemment identifiés ne semblent pas remplir les critères classiques de structure, ce qui suggère qu'ils ne sont probablement pas de véritables snoARN canoniques. Toujours dans le cadre de cette étude sur les effets du vieillissement sur les performances sensori-motrices, diverses mutations dans ce locus ont été générées. En outre, l'excision du transposon a provoqué

une petite délétion de 632 pb de la région génomique contenant le *sno1*, mais également les *sno2* et *sno3*, générant ainsi une mutation qui a été nommée *F4* (Fig. 33). Cette délétion a eu pour conséquence une réduction significative de la durée de vie des mouches d'environ 21% par rapport aux contrôles (313). Pour démontrer que ce phénomène est dû à la suppression des snoARN, des lignées transgéniques contenant un fragment d'ADN de 1 723 pb comprenant la région génomique et régulatrice des trois snoARN ont été générées (Genomic Rescue : *GR3*, *GR4* et *GR6*) (Fig. 33). Par la suite, ces transgènes ont été amenés dans le fond génétique mutant (*F4;GR3*, *F4;GR4* et *F4,GR6*) et ont montré être capables de restaurer la longévité (Fig. 33) (313). Or dans le contexte sauvage, ce transgène seul, donc une surexpression, permet, quant à elle, d'étendre la durée de vie des mouches d'environ 12% (313). Ces premiers éléments montrent que ces snoARN ont un rôle déterminant dans la longévité des mouches.

Comme seul le *sno1* (*snoARN:Ψ285-1153*) a été identifié comme étant un snoARN canonique selon l'étude bio-informatique, nous émettons l'hypothèse que le *sno1* pourrait potentiellement être l'unique snoARN fonctionnel dans ce locus. Pour une question de simplicité, ce nouveau snoARN (*sno1*) a été nommé *jouvence*. Vu sa récente identification dans le génome de la drosophile, la prochaine étape a été de visualiser l'expression spatiale de *jouvence* par hybridation *in situ* sur mouche entière, afin de déterminer dans quels tissus *jouvence* pourrait être exprimé et nécessaire pour affecter la durée de vie. Les résultats ont révélé que *jouvence* a été exclusivement détecté dans le nucléole des cellules nourricières des ovaires et dans les cellules épithéliales de l'intestin chez les mouches contrôles, et comme attendu aucune expression n'a été observée chez les mutants (313). Cependant, de façon surprenante, *jouvence* a uniquement été retrouvé dans les cellules épithéliales de l'intestin chez les différentes lignées de sauvetage (*F4;GR4* et *F4,GR6*), et non pas dans les cellules nourricières des ovaires (313). De plus, des résultats plus poussés (expériences de triple marquages avec des lignées pilote *GAL4* spécifiques des différents types cellulaires de l'intestin) indiquent une expression de *jouvence* restreinte aux EC, les principales cellules qui constituent plus de 90% de l'épithélium de l'intestin (313). Ainsi, ces données suggèrent que les effets sur la longévité sont probablement dus à son expression dans les cellules épithéliales intestinales et non dans les ovaires. Effectivement, l'expression ciblée de *jouvence* spécifiquement dans l'intestin, voire dans les EC, avec différentes lignées de l'intestin, telles que la *MYO14-GAL4*, la *Mex-GAL4* ou la *Mex-GAL4-GS*, permet une extension de la durée de vie des mouches (313). *jouvence* est donc requis et suffisant dans les EC pour influencer la longévité des mouches. De plus, ces données ont montré une nouvelle fois que les effets sur la longévité observés depuis le début sont bien dus à *jouvence* et non au *sno2* et/ou *sno3*.



**Figure 33 – Carte génomique du locus P[GAL4]4C.**

Le fragment de *jouvence* de 148 pb en **bleu**, celui du *sno2* de 166 pb en **orange** et le fragment du *sno3* de 157 pb en **rose** ont été utilisés pour générer les différentes constructions transgéniques présentes dans cette étude, soit l'*UAS-jou*, l'*UAS-sno2* et l'*UAS-sno3*. *jouvence* (*snoARN:Ψ28S-1153*), ainsi que les *sno2* (*snoARN:2R:9445205*) et *sno3* (*snoARN:2R:9445410*) localisés en amont, sont orientés dans le sens inverse des deux gènes codants *CG13333* et *CG13334*. La délétion *F4* de 632 pb en ligne pointillée **rouge** inclut les trois snoARN. En ligne continue **rouge**, le fragment d'ADN génomique de 1 723 pb (*GR3*, *GR4* et *GR6*) a été utilisé pour générer les différentes mouches transgéniques dans le fond génétique sauvage et ensuite ramené dans le fond génétique mutant *F4* (*F4;GR3*, *F4;GR4* et *F4;GR6*). Source : Prise de (313).

## 1.2. Plasticité de l'épithélium intestinal au cours du vieillissement.

L'intestin moyen de la drosophile, c'est-à-dire l'équivalent fonctionnel de l'intestin grêle des mammifères, est constitué d'un épithélium pseudostratifié entouré d'une lame basale et d'une couche de cellules musculaires viscérales. L'épithélium intestinal est caractérisé par une monocouche de cellules, qui est principalement peuplée par deux types de cellules différenciées : les EC, de grandes cellules polyploïdes à fonction absorbante, et les CEE, une population moins abondante de cellules diploïdes à fonction sécrétrice (254) (256). L'épithélium intestinal est en contact permanent avec l'environnement extérieur, et de ce fait il endure de multiples agressions. L'homéostasie de ce tissu repose alors sur sa capacité de régénération. C'est un tissu en continuel renouvellement tout au long de la vie de l'organisme. Ce rendement est soutenu par une petite population de CSI dispersée le long de la membrane basale de l'intestin moyen par rapport au reste des types de cellules épithéliales, et présentent une morphologie en forme d'étoile (264) (266). Contrairement aux mammifères, les CSI sont le seul type de cellules qui se divisent dans l'épithélium de l'intestin moyen (264) (266). Lors de la division cellulaire, les descendants des CSI régénèrent le pool de cellules souches et/ou deviennent des cellules progénitrices quiescentes, appelées les EB, qui se différencient finalement en EC ou CEE pour remplacer les cellules mortes (263) (264).

Depuis la découverte de l'existence des CSI en 2006, un grand travail a été fait pour étudier les signaux qui induisent leur division assurant ainsi la maintenance de l'intégrité de l'épithélium, et par conséquent la survie de l'animal (263) (264). Certaines études ont caractérisé ces cellules dans un contexte naturel et d'autres ont rapporté leur activité en réponse à des stress (attaques pathogènes, lésions, etc...). Dans des conditions basales, les cellules différenciées sont régénérées environ une fois par semaine chez les mâles et une fois toutes les deux semaines chez les femelles, mais ce renouvellement peut être accéléré par des facteurs internes ou

environnementaux (263) (264). Notamment, il a été démontré qu'un certain nombre de voies de signalisation conservées, telles que l'insuline, Notch, EGFR, Wg/Wnt, mTOR, JNK et JAK-STAT, sont impliquées dans la régulation de la prolifération et la différenciation des CSI, ainsi que dans le maintien de l'homéostasie tissulaire de l'intestin moyen de la drosophile (266) (272) (274) (275) (276) (277) (324) (325). Or, cette fonction régénératrice des CSI peut avoir des conséquences néfastes pour l'organisme, comme une surprolifération des CSI entraînant une accumulation de cellules progénitrices mal différenciées dans l'intestin et perturbant ainsi l'intégrité épithéliale. Ce phénomène définit la dysplasie intestinale et est largement observée dans l'intestin des vieilles mouches (275). Effectivement, des études révèlent que la capacité des CSI à maintenir l'homéostasie tissulaire diminue fonctionnellement avec l'âge, et que ce déclin peut être associé à un large éventail de pathologies allant des troubles intestinaux inflammatoires aux cancers intestinaux (326). Cette hyper-prolifération des CSI contribue à la perte de la fonction intestinale, mais aussi à une augmentation accrue à la mort des mouches vieillissantes (147) (180). Cependant, on sait peu de choses sur les mécanismes de déclenchement de ce phénomène. Basée sur de nombreuses études, il a été montré que cette dégénérescence cellulaire intestinale est causée par une activation chronique liée à l'âge de la signalisation JNK dans l'intestin (275) (293). De plus, les mouches âgées ont également des charges bactériennes plus élevées dans leur intestin (dysbiose intestinale) déclenchant une réponse inflammatoire et une dérégulation du système immunitaire (293). Ces différents phénotypes endommagent alors l'épithélium, entraînant une prolifération excessive des CSI et une mauvaise différenciation des cellules progénitrices.

En vue de sa localisation spécifique dans les EC, nous avons voulu savoir si, dans le mutant *jouvence*, on observe des lésions tissulaires, voire le même phénomène dans l'activation des CSI dans l'épithélium intestinal. Pour cela, j'ai procédé à une analyse phénotypique de l'intestin moyen.

## 2. Résultats.

### 2.1. Résultats publiés.

La majeure partie des résultats obtenus sur la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de *jouvence* dans l'épithélium intestinal ont été publiés dans le journal *Nature Communication* en Février 2020 (313). Cette publication est le fruit d'un travail collectif et ma thèse s'est plus centrée sur l'effet de *jouvence* sur l'homéostasie cellulaire dans l'intestin. Les travaux présentés ici ont ouvert des perspectives que nous avons explorées plus tard. Ces travaux complémentaires ont été menés pour étudier plus en avant le rôle fonctionnel de *jouvence* dans l'intestin, plus particulièrement sur un plan métabolique.

# *Jouvence* a small nucleolar RNA required in the gut extends lifespan in *Drosophila*

Stéphanie Soulé <sup>1,4</sup>, Lucille Mellottée <sup>1,4</sup>, Abdelkrim Arab<sup>1</sup>, Chongjian Chen<sup>2,3</sup> & Jean-René Martin <sup>1</sup>✉

Longevity is influenced by genetic and environmental factors, but the underlying mechanisms remain elusive. Here, we functionally characterise a *Drosophila* small nucleolar RNA (snoRNA), named *jouvence* whose loss of function reduces lifespan. The genomic region of *jouvence* rescues the longevity in mutant, while its overexpression in wild-type increases lifespan. *Jouvence* is required in enterocytes. In mutant, the epithelium of the gut presents more hyperplasia, while the overexpression of *jouvence* prevents it. Molecularly, the mutant lack pseudouridylation on 18S and 28S-rRNA, a function rescued by targeted expression of *jouvence* in the gut. A transcriptomic analysis performed from the gut reveals that several genes are either up- or down-regulated, while restoring the mRNA level of two genes (*ninaD* or CG6296) rescue the longevity. Since snoRNAs are structurally and functionally well conserved throughout evolution, we identified putative *jouvence* orthologue in mammals including humans, suggesting that its function in longevity could be conserved.

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR-9197, Equipe: Imagerie Cérébrale Fonctionnelle et Comportements (ICFC), CNRS/Université Paris Sud, 1 Avenue de la Terrasse (Bat. 32/33), 91198 Gif-sur-Yvette, France. <sup>2</sup>Genetics and Developmental Biology Department, Mammalian Developmental Epigenetics Group (E. Heard Lab.), Institut Curie, CNRS UMR-3215, U934 Inserm, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France. <sup>3</sup>Present address: Corporate HQ: Building B2, Yard 88, kechuang 6 Rd, Beijing Economic-Technological Development Area, 100176 Beijing, China. <sup>4</sup>These authors contributed equally: Stéphanie Soulé, Lucille Mellottée. ✉email: [jean-rene.martin@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:jean-rene.martin@inaf.cnrs-gif.fr)



The aging process is the result of complex biological mechanisms leading to accumulation of different types of damage at molecular, cellular, tissue and organ levels. This leads to the decrease or loss of certain physiological functions, and therefore, to an increase of vulnerability to diseases and death<sup>1,2</sup>. Several genes and metabolic factors have been reported to modulate longevity<sup>3–16</sup>. Indeed, genes that increase longevity have been identified in different model organisms, such as yeast<sup>3,4</sup>, *C. elegans*<sup>17</sup>, *Drosophila*<sup>5–16</sup> and mouse<sup>18</sup>. More particularly, in *Drosophila*, these include *mathuselah*<sup>5</sup>, insulin-signalling pathway genes<sup>6,7,15</sup>, Cu/Zn superdismutase<sup>9</sup>, sirtuin<sup>3,4,10</sup>, and genes affecting either the regulation of mitochondria as PGC-1<sup>11</sup> or the mitochondrial respiratory chain<sup>12</sup>. It is also well accepted that lifespan is environmentally modulated. In addition, longevity positively correlates with the ability to resist to stress. In such way, environmental factors like diet<sup>1</sup>, and stress<sup>5,14</sup> also modulate an organism's lifespan. More recently, some microRNAs (miRNAs) were identified as key regulators of genes involved among other processes as neurodegeneration, in aging<sup>19–21</sup>.

The snoRNAs are members of a group of non-coding RNAs. SnoRNAs are found in species from archeobacteria (in which they are named sRNAs) to mammals<sup>22</sup>. They are known to be present in the nucleolus, in which they are associated with a set of proteins to form small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNPs)<sup>22</sup>. They are generally known to be processed from introns of pre-mRNAs. They are believed to have several functions, including the 2'-O-methylation and pseudouridylation of different classes of RNA, the nucleolytic process of the rRNA, telomeric DNA synthesis<sup>22,23</sup>, as well as they can target the spliceosomal snRNAs (whose are their main targets after rRNAs). Based on conserved secondary structure and functional RNA motifs, two major classes have been distinguished, the box C/D and box H/ACA. The box C/D, comprising notably the multiple "U" snoRNAs (although not all "U" are necessarily snoRNAs), generally performs the 2'-O-methylation of ribosomal RNA, while the box H/ACA directs the conversion of uridine to pseudouridine, and so particularly of rRNA<sup>22,23</sup>. However, recent studies have demonstrated that the H/ACA snoRNA might also pseudouridinate other RNA substrates, such as mRNA and long-non-coding-RNAs (lncRNAs)<sup>24</sup> or have a role in chromatin remodelling, indicating that they have several other functions<sup>25</sup>. Then, although few H/ACA box snoRNA have been involved in human diseases<sup>26,27</sup>, their role at the organismal level and more particularly in aging has not yet been documented.

Here, we characterize a small nucleolar RNA (snoRNA:Ψ28S-1153) that we name *jouvence* (*jou*) and show that its deletion reduces lifespan. A transgene containing the genomic region of *jou* is able to rescue the lifespan, while its overexpression increases it. In situ hybridization (ISH) reveals that *jou* is expressed in the enterocytes, the main cell-types of the epithelium of the gut. At the cellular level, in *jou*-deleted flies, the number of enterocytes as well as the proliferative cells increase leading to an intestinal hyperplasia. Genetic targeted expression of *jou* in the enterocytes prevents the hyperplasia, which is sufficient to rescue and significantly increase longevity, and so, even when it is expressed only in adulthood (through Gene-Switch conditional expression). Finally, as snoRNAs are generally well conserved throughout evolution, both structurally and functionally, we identify putative *jou* mammalian orthologues, both in mouse and human, suggesting that it may have an implication in mammalian aging.

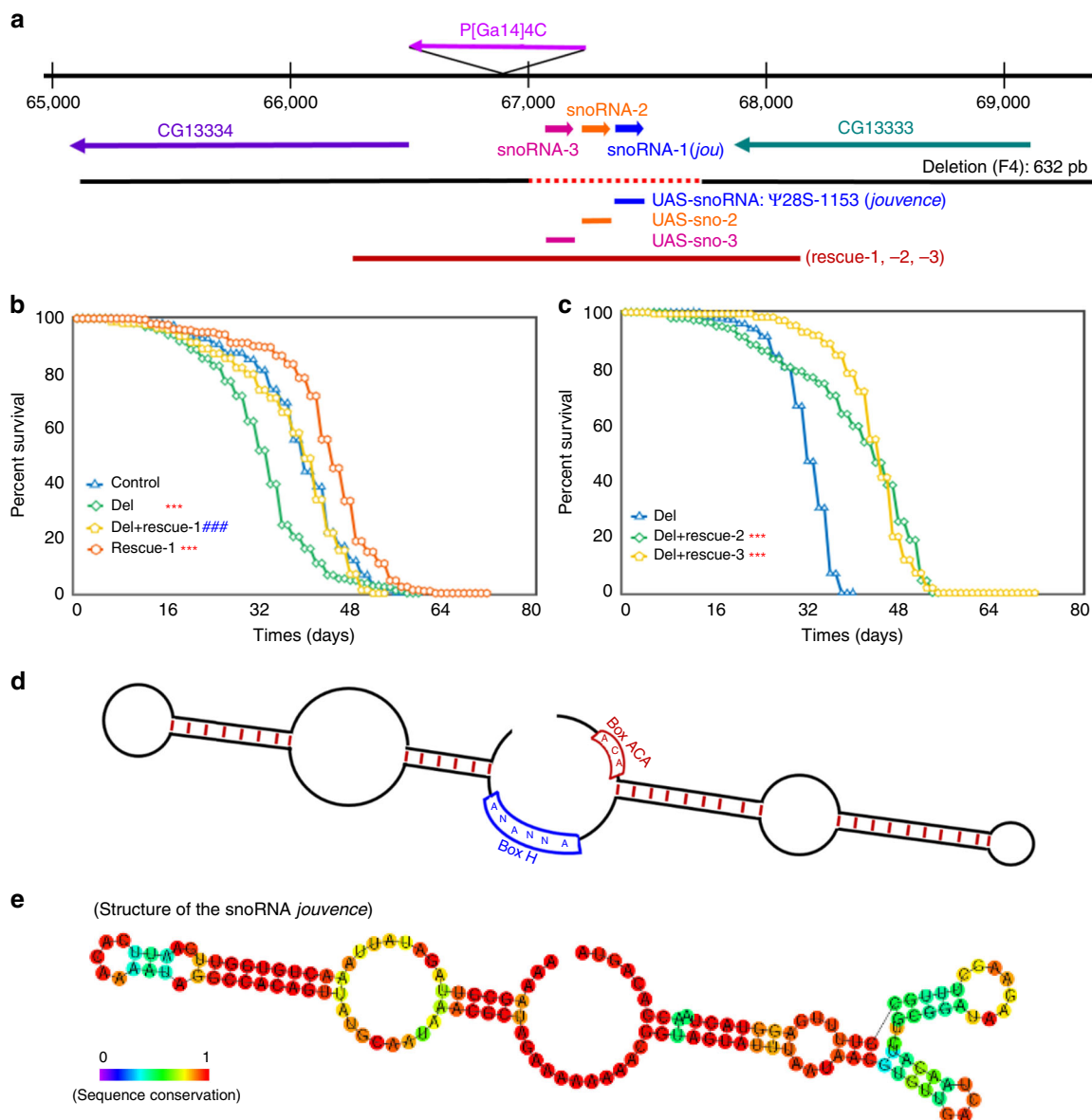
## Results

**Genetic and molecular characterization of the snoRNA *jouvence*.** Aging involves a progressive decline and alteration in tissues and sensory-motor functions<sup>28–30</sup>. In a study to characterize

putative genes involved in locomotor activity and more particularly genes expressed in the central complex (CC), a premotor centre localised in the middle of the brain<sup>31</sup>, a P-element insertional mutagenesis was performed. We identified the enhancer-trap line P[GAL4]4C, and show that the blockage of the targeted ring neurons disrupts the power law distribution of walking time intervals<sup>32</sup>. Here, in a step further, we molecularly characterize the P[GAL4]4C line, as well as we study it in the context of aging and particularly in aging effects on sensory-motor performance. P[GAL4]4C is inserted on the second chromosome, at position 50B1 (Fig. 1a), between two putative genes: CG13333 and CG13334. CG13333 is embryonically expressed<sup>33</sup>, while CG13334 shows a partial and weak homology to the lactate dehydrogenase gene. Furthermore, a bioinformatic study<sup>34</sup> has annotated a snoRNA (snoRNA:Ψ28S-1153) between CG13333 and CG13334 near the P[GAL4]4C insertion (Fig. 1a), while a recent developmental transcriptomic analysis has annotated two additional putative snoRNAs (snoRNA:2R:9445205 and snoRNA:2R:9445410) (<http://flybase.org/>)<sup>35</sup> localized just upstream to the first snoRNA:Ψ28S-1153. However, according to the canonical definition of snoRNA in which the H/ACA box is predicted to form a hairpin-hinge-hairpin-tail structure (Fig. 1d), while the C/D box is predicted to form a single hairpin<sup>22,23</sup>, these two last snoRNAs do not fulfil these two criteria, suggesting that they are likely not true or, at least canonical snoRNAs. Whereas the snoRNA:Ψ28S-1153 forms a typical H/ACA double hairpin (Fig. 1e). To generate mutations in this complex locus, the P[GAL4]4C was excised, using the standard genetic method of excision<sup>36</sup> resulting in a small 632 bp deletion (F4) (shortly named: Del) (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a), which completely removed the snoRNA:Ψ28S-1153 as well as the other two RNAs. Next, we performed RT-PCR to test if this deletion had an effect on the expression of the two encoding neighbouring genes. Both genes were normally expressed in the deletion line compared to control Wild-Type (WT) Canton-S (CS) flies (Supplementary Fig. 1b).

## Genomic deletion encompassing the snoRNA reduces lifespan.

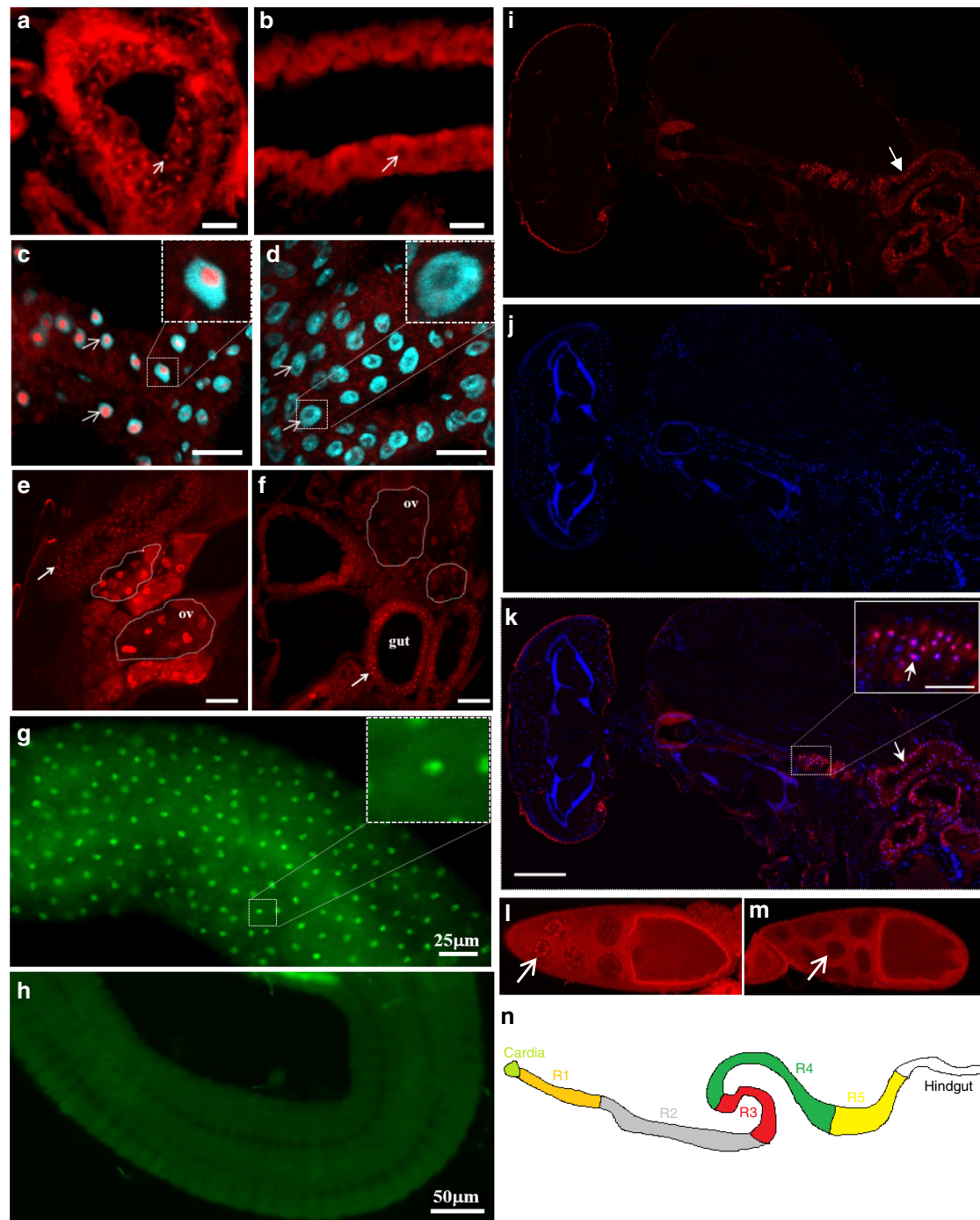
Interestingly, we observed by daily husbandry, that the deletion flies had a shorter lifespan. Hence we compared the longevity of these flies to that of Control CS. Since small variations in the genomic background can affect longevity, we outcrossed the deletion line a minimum of 6 times to CS (Cantonisation). Longevity tests (Fig. 1b) performed on females revealed that deletion flies lived shorter compared to control. To test the snoRNA's role in the longevity effect, three transgenic lines containing a DNA-fragment of 1723 bp, comprising the putative genomic and regulatory region of the snoRNAs (genomic-rescued named: rescue-1, 2 and 3) (Fig. 1a: red bar) were generated, and tested for longevity against the deletion background. Again here, these transgenic lines were outcrossed 6 times to CS and then crossed to the deletion to generate the Del+rescue-1, -2, -3 lines respectively. Longevity in Del+rescue-1 females was rescued, while lifespan in the rescue-1 line itself increased (Fig. 1b) (see Supplementary Fig. 1d for the replicate of this longevity experiment). Similar results were also observed with the two other independent insertions: rescue-2 and rescue-3 (Fig. 1c). In addition, as aforementioned, since longevity is very sensitive to the genetic background, we also tested the phenotype of the deletion in an independent genetic background (Berlin)<sup>37</sup>. The deletion flies in a Berlin genetic background still live shorter than their co-isogenic Berlin flies (Supplementary Fig. 1e), corroborating that deletion of this genomic region reduced lifespan and was not due to a bias in the genetic background. Finally, to check if the deletion of the genomic region encompassing snoRNA:Ψ28S-1153 presents a sexual dimorphism, we also determine longevity



**Fig. 1 Molecular map of the P[Ga14]4C locus and features of the snoRNA:Ψ28S-1153.** **a** Genomic map of the P[Ga14]4C locus. The snoRNA:Ψ28S-1153 (*jouvence*), as well as the two other putative upstream snoRNAs (sno-2 = snoRNA:2R:9445205 and sno-3 = snoRNA:2R:9445410), are in the inverse orientation of the two encoding genes: CG13333 and CG13334. The deletion (F4) of 632 bp (red dotted line) includes the three putative snoRNAs. The 1723 bp genomic DNA fragment (genomic-rescued named: rescue-1, rescue-2, and rescue-3) (red line) used to generate transgenic flies. The snoRNA-*jou* fragment (blue bar) of 148 bp used to generate the UAS-*jou*<sup>8M</sup> and pJRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup> constructs, the 166 bp fragment (orange bar) corresponding to the sno-2, and the 157 bp fragment (pink bar) corresponding to the sno-3. **b** Decreasing cumulative of Control (CS), Del (deletion F4), Del + rescue-1 and rescue-1. Note: the lifespan determination of these 4 groups of flies (genotypes) have been performed simultaneously, in parallel (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed Statistics, see Supplementary Information, Table 1) (\*\*\*) =  $p < 0,001$ , compared to Control; ### =  $p < 0,001$  compared to Deletion). **c** Similarly to (**b**), decreasing cumulative of females Del (deletion F4), Del+rescue-2, Del+rescue-3. In Del+rescue-2, Del+rescue-3, the lifespan is lengthened (for detailed Statistics: see Supplementary Information, Table 1). **b, c**  $p$ -value calculated by log-rank test. **d** Schematic representation of a H/ACA snoRNAs structure. **e** Schematic representation of the snoRNA:Ψ28S-1153 (*jouvence*), harbouring a typical H/ACA box structure. For **b, c** Source data are provided as a Source Data file.

in males (Supplementary Fig. 1f). Males deleted flies live longer than control WT. Interestingly, differences in lifespan between the sexes have already been reported in many species related to various longevity genes and/or signalling pathways, as for example, the *IIs*<sup>38–40</sup>. However, for the sake of simplicity, and since the precise determination of the sex difference in lifespan is a complex and full topic per se, here as a first step, we restrict our study to females.

**The snoRNA:Ψ28S-1153 is expressed in the gut epithelium.** Since only the snoRNA:Ψ28S-1153 has been identified in the bioinformatic study as a real/canonical snoRNA<sup>34</sup>, we hypothesize that this snoRNA might be potentially the only true functional snoRNA in this locus. In order to determine in which tissues snoRNA:Ψ28S-1153 could be expressed and required to affect lifespan, we performed ISH on the whole flies using fluorescently-labelled probes (Fig. 2). We then performed ISH



**Fig. 2** snoRNA:Ψ28S-1153 (*jou*) is expressed in the epithelium of the gut. In situ Hybridization (ISH) of the snoRNA-*jou* on whole fly (Cryostat section) reveals a restricted expression in the epithelium of the gut (red dots: white arrow) in Control (a), but absent in the deletion (b) (white arrow). c Magnified view taken with a confocal (×63) revealed that *jou* is expressed in the nucleolus (DAPI counter-staining), but absent in deletion (d) (scale bar = 25 μm). Inset (magnification) showing that *jou* is located in the nucleolus. e, f ISH (Cryostat section) of *jou* on transgenic whole flies (rescue-1 and Del+rescue-1). In rescue-1 (Wild-Type background) (e), *jou* expression was seen in the gut epithelium (red dots: white arrow) and ovaries (ov) (see also Supplementary Fig. 2), while expression was restricted to the gut epithelium in Del+rescue-1 and absent in the ovaries (ov) (f) (scale bar = 50 μm). g, h ISH, revealed with a FITC-labelled tyramide (green), on dissected gut of Wild-Type CS flies, in the midgut (g), *jou* is detectable in each cells of the epithelium. Inset (magnification): *jou* is visible in the nucleolus. h In the hindgut, *jou* is not expressed. i-k ISH on a whole Wild-Type CS fly (Cryostat section). i *jou* expression revealed with tyramide-Cy3 (white arrow). j DAPI-staining labelling the nucleus. k Overlay of (i), j Showing the expression of *jou* only in the epithelium of the gut (white arrow), but no expression in the nervous system. Notes: (1) ovaries are also positive but they are not visible on this section, (2) the red colour surrounding the head in (i) and (k) corresponds to the auto-fluorescence of the retina. Inset in (k) magnification view. red dots = *jou* in the nucleolus of the epithelium of the gut (scale bar = 200 μm, Inset: scale bar = 50 μm). l, m ISH on ovaries. Stacks of confocal images showing *jou* expression in the nucleolus of Control (l) and absent in deletion (m). n Schematic drawing of the gut showing its different main regions.

with this probe and found that it was expressed in gut epithelial nucleoli and the proventriculus (Fig. 2a, c), but as expected, its expression was absent in deletion line (Fig. 2b d). Moreover, a counter-staining with DAPI suggest that it is localised in the nucleolus (Fig. 2c and d). In addition, whole-body examination revealed that the snoRNA:Ψ28S-1153 was also expressed in ovarian nurse cell nucleoli in control flies (Fig. 2e, f and l, m and Supplementary Fig. 2), but not in any other tissues, including the nervous system (see Fig. 2i, j, k for the expression pattern of the whole fly, including the head, the nervous system and the thorax). Similarly, when the rescue construct was combined with the deletion line, snoRNA:Ψ28S-1153 expression was restricted to gut epithelial cells, though surprisingly, not in the ovaries (Fig. 2e, f). Additional ISH performed on dissected gut of Wild-Type flies confirmed that the snoRNA:Ψ28S-1153 was expressed more precisely in the midgut (Fig. 2g), but not in the hindgut (Fig. 2 h) (see Fig. 2n for a schematic view of the gut). These results suggested that effects on longevity of snoRNA:Ψ28S-1153 were likely due to its expression in the gut epithelial cells, and not in the ovaries, although at this stage of this study, the role of the two other putative snoRNAs could not be completely excluded.

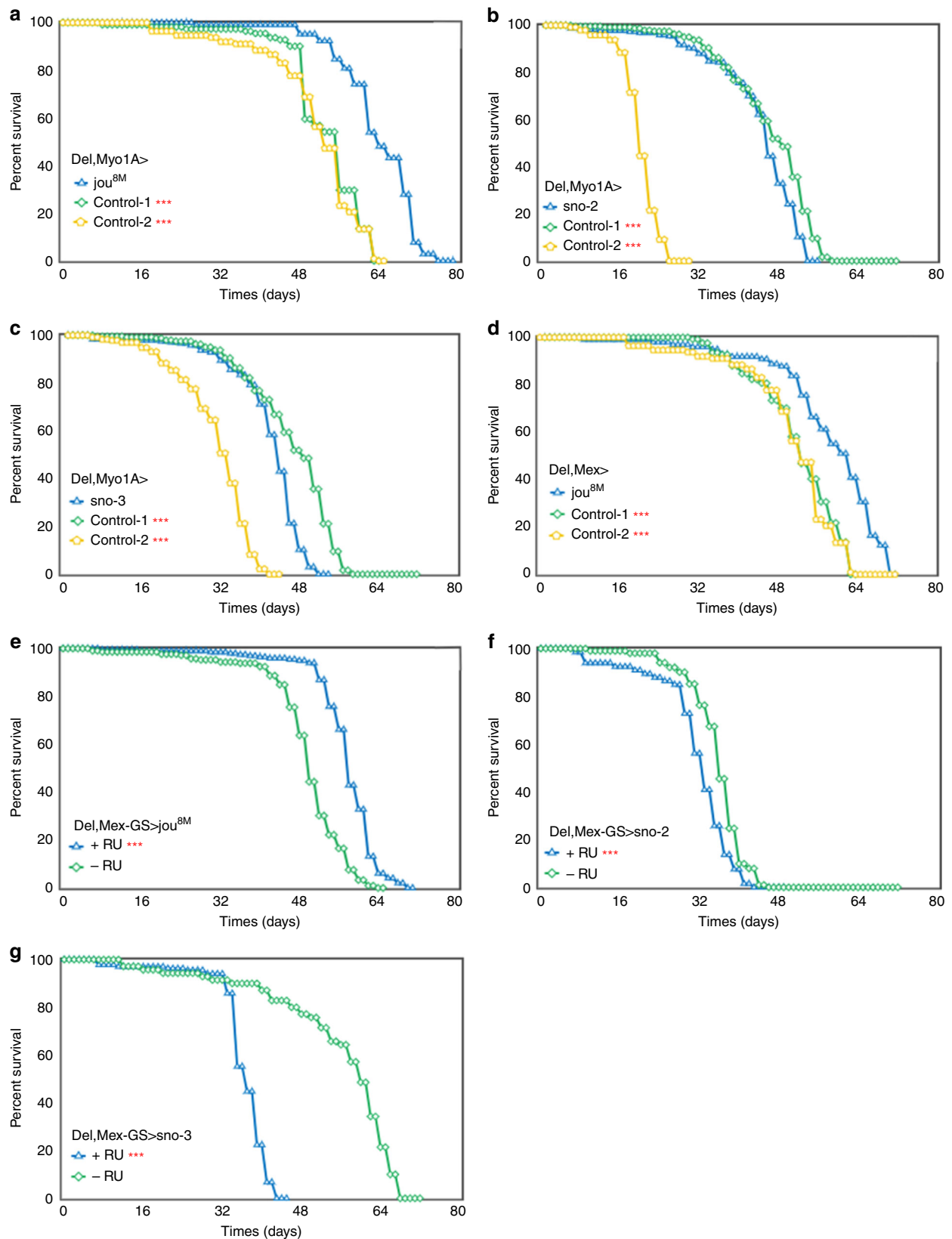
The gut epithelium is composed of four cell-types: enterocytes (ECs), enteroblasts (EBs), entero-endocrine cells (EEs) and intestinal stem cells (ISCs)<sup>41–44</sup>. We specifically marked these cell types by combing ISH with GFP expression driven by cell type-specific drivers. To target and label the ECs, we used the Myo1A-Gal4 driver (NP1-Gal4), an enhancer trap in myosin 1A gene, encoding a gut specific brush border<sup>45</sup>. As described by Jiang et al.<sup>46</sup>, Myo1A-Gal4 is strongly expressed in all midgut ECs, while no expression was detected in ISCs, EBs, EEs, or visceral muscle. To label the EBs, we used the Su(H)GBE-Gal4<sup>44</sup>, while the ISCs were marked by both *esg*-Gal4 and *DI*-Gal4. Amongst these, only EC-specific expression (Myo1A-Gal4 showed *jou* co-labelling with the GFP reporter (Supplementary Fig. 3), indicating that its localisation was restricted to enterocytes.

**The snoRNA:Ψ28S-1153 in adulthood extends lifespan.** To corroborate the previous results obtained with the genomic rescued transgene (Del+rescue-1) and confirm that the longevity effect is due to the snoRNA-Ψ28S-1153 in the epithelial cells of the gut, and not to the two other putative snoRNAs, we generated a p[UAST-snoRNA-Ψ28S-1153] (named pUAS-*jou*<sup>8M</sup>) transgenic line. Then, we targeted this unique snoRNA expression specifically to enterocytes in deletion background using Myo1A-Gal4 line (Del,Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) and verified by ISH that the snoRNA was indeed correctly expressed in the enterocytes (Supplementary Fig. 3e). Furthermore, the expression of the snoRNA-Ψ28S-1153 specifically in enterocytes was sufficient to increase the longevity of the flies (Fig. 3a), compared to their two respective controls (Gal4 line alone in heterozygous and UAS-*jou*<sup>8M</sup> alone in heterozygous) (for a second replicate, see Supplementary Fig. 4a). Remark that in the control line bearing the P[Gal4] driver in heterozygous (Del,Myo-Gal4/Del) the longevity is increased compared to the *jou*-deleted flies (Fig. 1b). This increase is due to an insertional effect of the P[Gal4] driver itself, since the recovery (de-recombination) of the deletion from this line, *de novo* gives a similar longevity to the original deletion line (Supplementary Fig. 4f). In addition, to investigate if the two other putative snoRNAs (snoRNA:2R:9445205 and snoRNA:2R:9445410, short-named *sno-2* and *sno-3* respectively) localized just upstream to the snoRNA:Ψ28S-1153 were also involved in the lifespan determination, the targeted expression of *sno-2* and *sno-3* in ECs (Del, Myo1A>UAS-*sno-2* and Del,Myo1A>UAS-*sno-3*) (Fig. 3b, c), did not increase lifespan of the deletion line encompassing snoRNA:Ψ28S-1153, indicating that only the snoRNA:Ψ28S-1153

expression in ECs is capable to rescue lifespan among these three snoRNAs. To further support this demonstration, we also observe a rescue of longevity defects compared to their co-isogenic control flies by expression of snoRNA-Ψ28S-1153 (UAS-*jou*<sup>8M</sup>) with a second Gal4 driver line, *Mex-Gal4*<sup>47</sup>, which is also expressed in the epithelium of the gut though not exclusively in the ECs<sup>48</sup> (Fig. 3d). In the deletion background, the targeted expression in the epithelial cells of the gut by *Mex-Gal4* also increases lifespan. In addition, to exclude that putative insertional effect of the UAS-*jou*<sup>8M</sup> could lead to some longevity effects per se, we have generated a second and independent UAS-*jou* construct into the pJFRC-MUH vector (a more recent and updated pUAST vector, which also contains directed insertional sites)<sup>49</sup> and generate a transgenic fly line (named pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) inserted at the attP2 site located at position 68A4 on the third chromosome. We then repeated the longevity experiments using the same P[Gal4] driver lines (Del,Myo1A-Gal4>pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup> and Del,*Mex-Gal4*>pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>). Both of them lead to an increase of longevity (see Supplementary Fig. 4b, c), a similar result obtained with the UAS-*jou*<sup>8M</sup> construct, demonstrating that it due to the expression of the snoRNA-*jouvence*.

We then wanted to exclude that expression of snoRNA:Ψ28S-1153 by Myo1A-Gal4 and the *Mex-Gal4* during development rescues longevity defects. We, therefore, generated a conditional Gal4 Gene-Switch line (*Mex-GS*) to allow expression of the UAS-*jou*<sup>8M</sup> only in adult stages. As a first step, we confirm that the Gene-Switch construct and the transgenic flies were functional and the induction of the reporter transgene occurs following feeding of the flies with the RU486. Supplementary Fig. 5f, g (and see Supplementary Fig. 14 for the whole animal) shows that in RU486 fed flies of *Mex-GS*>UAS-GFP, as expected, the expression of the GFP is easily detectable in the gut of adult flies, validating the system. Second, in the deletion genetic background, feeding flies with RU486 starting just after the hatching and so, during adulthood, led to an increase of lifespan compared to the sibling control flies without RU486 (Fig. 3e). Similar results were also obtained with the pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup> construct (Del,*Mex-GS*>pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) (Supplementary Fig. 4d). In complement, to verify and rule-out that the positive longevity effect is not due the RU486 itself, we determine the longevity in control flies without the *Mex-GS* driver (Del;pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) (Supplementary Fig. 4e; see also other RU486 controls in Supplementary Fig. 5c–e). Interestingly, we do not observe any difference in longevity between the two groups of same genotype flies: no-fed versus fed with RU486. In contrast, similar RU486 inducible experiments targeting either the UAS-*sno-2* or the UAS-*sno-3* did not yield to an increase of lifespan but rather to a decrease of lifespan (Fig. 3f, g) indicating that the targeted expression of these two snoRNAs respectively could be deleterious (a result similar to the one's obtained with the Myo1A-Gal4 driver: Fig. 3b, c), and consequently confirming that *jouvence* is the snoRNA responsible for the lengthening of lifespan.

To confirm the snoRNA:Ψ28S-1153 expression levels and to temptingly correlate it to longevity, we performed a quantitative PCR on the dissected gut (Supplementary Fig. 6a–c). As expected, the snoRNA:Ψ28S-1153 is not detected in deletion line, whereas its expression is rescued in genomic-rescued line (Del+rescue-1) compared to Control (CS). Moreover, its expression is significantly increased (4 folds) in rescue-1 transgenic flies (in WT genetic background), confirming overexpression in this line that carries four copies of the snoRNA-*jouvence*. We also quantify the level of the snoRNA on dissected gut (Supplementary Fig. 6b) in the two gut-driver lines. The levels of the snoRNA:Ψ28S-1153 was increased about 500-fold for the Myo1A and about 600-fold with *Mex-Gal4* (driving UAS-*jou*<sup>8M</sup>). Similarly the *Mex-Gene-Switch*



driving the snoRNA-*jou* (Del,Mex-GS>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) induced an increase of *jou* after RU486 induction (up to 5 folds) (Supplementary Fig. 6c). Thus, increased levels of snoRNA:Ψ28S-1153 were always correlated with increased longevity.

**Overexpression of *jou* in WT flies increases lifespan.** Since in the deletion background, the targeted expression of the snoRNA:Ψ28S-1153 specifically in the enterocytes rescued the phenotype, we wondered if the overexpression of this snoRNA in

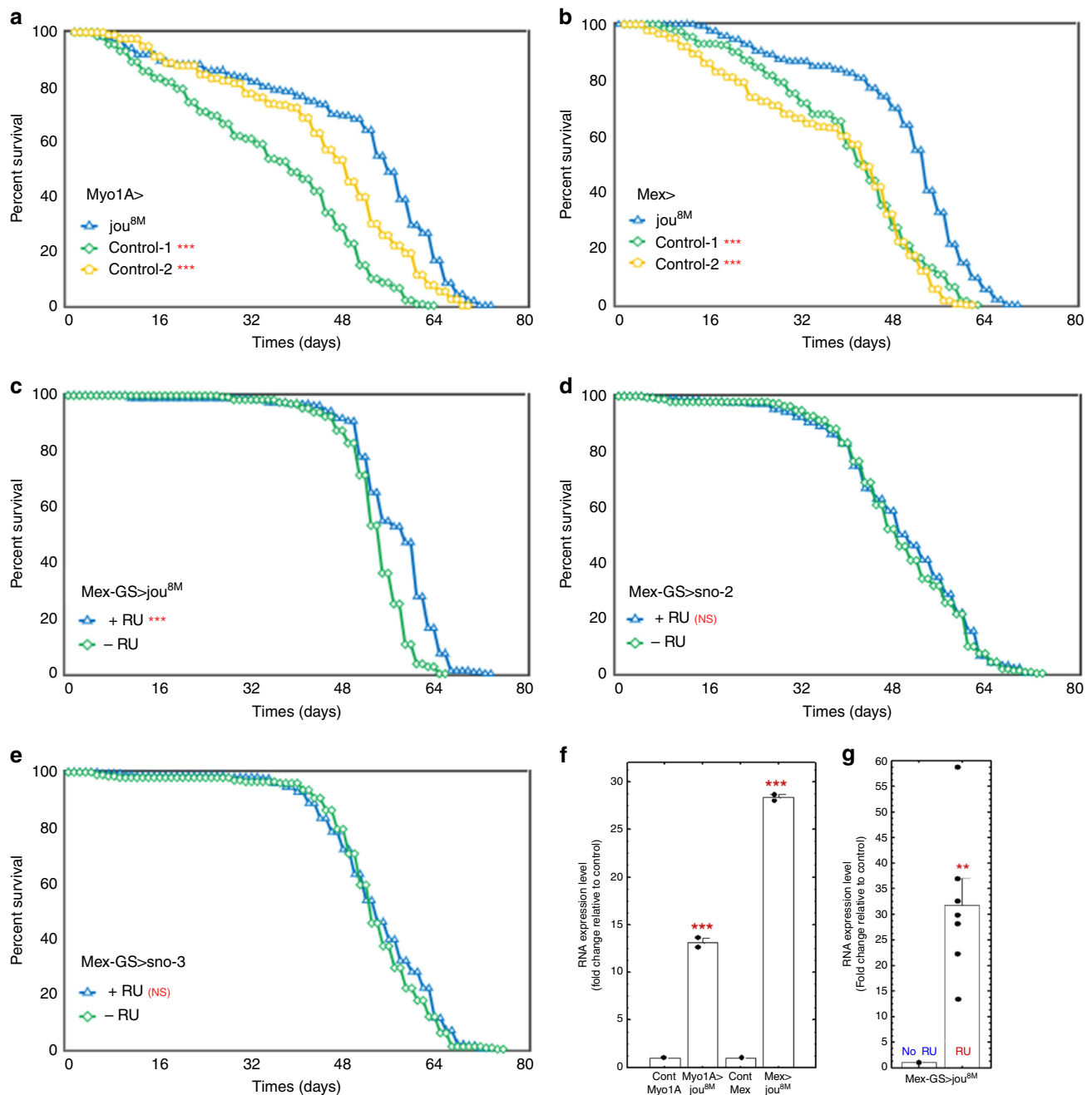
**Fig. 3 Targeted expression of *jou* in enterocytes is sufficient to rescue the longevity.** Longevity test results (survival curve—decreasing cumulative) of the targeted expression of the snoRNA:Ψ28S-1153 specifically in the enterocytes in deletion compared to their controls. **a** Del,Myo1A-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup> expression in enterocytes is sufficient to increase lifespan. (Control-1 = Del,Myo1A-Gal4/Del, Control-2 = Del/Del;UAS-*jou*<sup>8M</sup>/+). **b, c** The expression of the two other snoRNAs: sno-2 (**b**), or the sno-3 (**c**), do not lead to an increase of lifespan, and even it seems to be slightly deleterious. **d** A second gut driver line, Mex-Gal4 (Del,Mex-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) which also targets the expression in enterocytes is sufficient to increase lifespan. **e** The conditional Mex-GS flies (Del,Mex-GS>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) fed with the RU486 only in adulthood, which triggers the expression of the snoRNA-*jou*, is sufficient to increase lifespan compared to the non-fed (non-induced) sibling flies. **f, g** Mex-GS flies fed with RU486 only in adulthood, which triggers the expression of the sno-2 (**f**) or sno-3 (**g**), do not increase lifespan compared to the non-fed (non-induced) sibling flies, but it is rather deleterious. In each longevity panel, Control-1 = Del,Gal4-driver/Del, meaning the Gal4 driver without the UAS-construct), Control-2 = Del/Del;UAS-construct/+, meaning the UAS-*jou*<sup>8M</sup>, or sno-2, or sno-3, in heterozygous, without the Gal4 driver (Notice: same nomenclature for all other rescued longevity Figures). (\*\*\*) =  $p < 0,001$  (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed statistics, see Supplementary Information, Table 1).  $p$ -value calculated by log-rank test. For all panels, Source data are provided as a Source Data file.

a Wild-Type genetic background (CS) could be beneficial leading to an increase of lifespan or in contrast, be deleterious. We used the same driver lines to overexpress the snoRNA:Ψ28S-1153 up to 13-fold (Myo1A-Gal4) and 28-fold (Mex-Gal4) over that of endogenous expression (Fig. 4f). Both Gal4-drivers expressing the snoRNA gave similar results, showing increased longevity (Fig. 4a, b), compared to their co-isogenic control flies. Again here, similar results were obtained with the pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup> construct (Mex-Gal>pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) (Supplementary Fig. 5a). Moreover, conditional adult-specific expression via RU486 feeding in the Mex-GS line (30X increased expression: Fig. 4g) also increased lifespan compared to the non-induced flies (Fig. 4c), as well as with the second independent transgenic line (Mex-GS>pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) (Supplementary Fig. 5b). Again here, to ensure that the longevity effect is not a secondary effect due to the RU486 itself, three independent controls have been conducted: the Gene-Switch driver alone without the UAS-*jou* (Mex-GS/CS), and the two independent UAS-*jou* lines without the driver line (UAS-*jou*<sup>8M</sup>/CS and pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>/CS): all three controls don't show any difference in longevity comparing fed versus non-fed flies with RU486 (Supplementary Fig. 5c–e). Finally, the induction of the overexpression in adulthood, by the Mex-GS, of the sno-2 or the sno-3 did not alter lifespan compared to their respective co-isogenic control flies (Fig. 4d, e), corroborating that the snoRNA-*jou* is critical for lifespan determination. In conclusion, since the snoRNA:Ψ28S-1153 increases lifespan when it is overexpressed in the epithelium of the gut, we conclude that it could be considered as a longevity gene, and therefore we named it “*jou*ence” (*jou*) (which means “youth” in English).

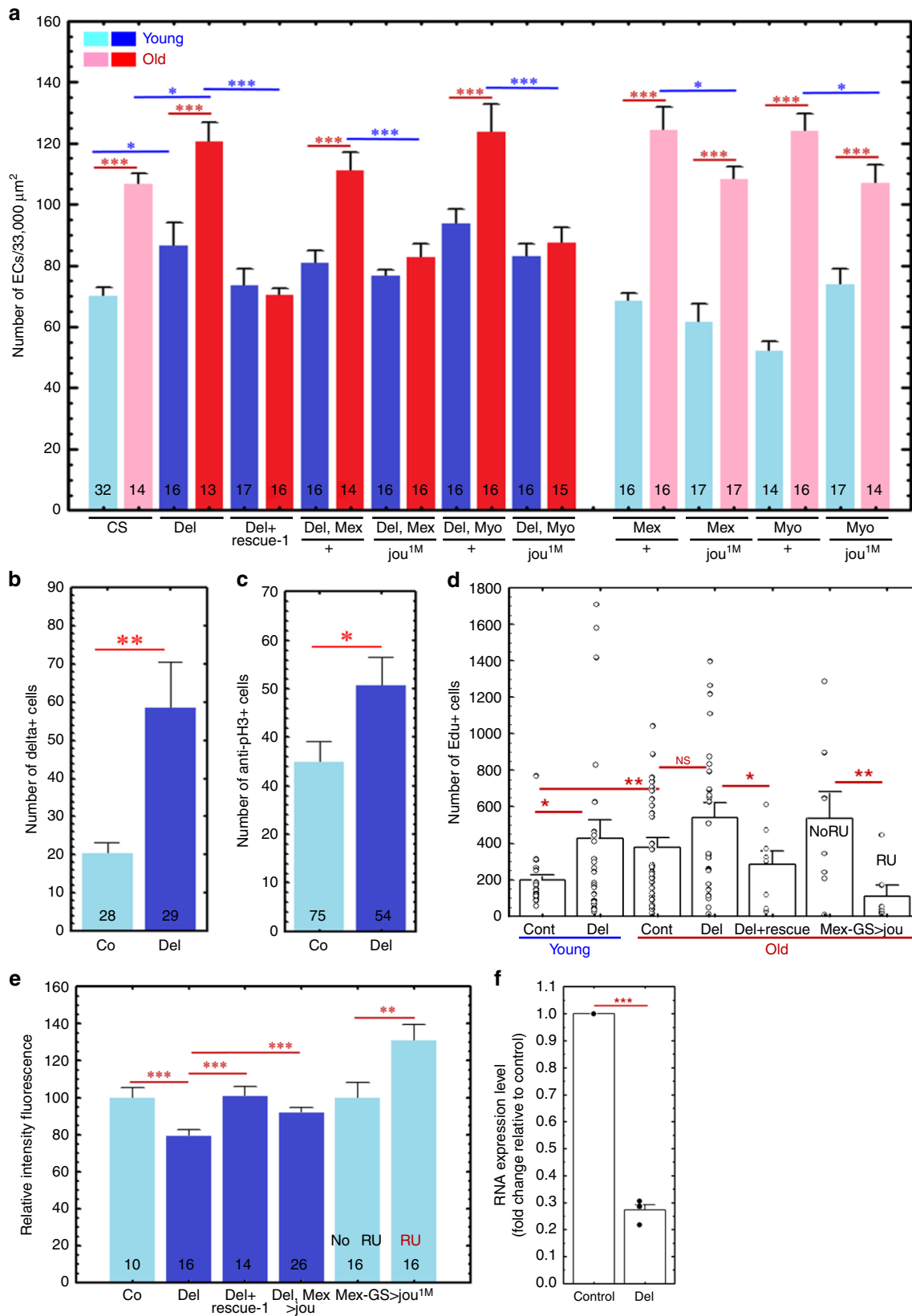
**Overexpression of *jou*ence prevents the gut hyperplasia.** In aged flies, the intestinal epithelium degenerates leading to intestinal hyperplasia<sup>50,51</sup>. Then, we wonder if the deletion of the snoRNA-*jou*ence affects the homeostasis of the gut and leads to cellular lesions. To assess such hyperplasia, we count the number of enterocytes both in young (7 day-old) and old (40-day-old) flies. We observe that this number is increased in the *jou*-deleted flies compared to their respective WT controls (Fig. 5a), indicating a hyperplasia. Interestingly, such increase in the number of enterocytes is not observed in the old (40-day-old) flies carrying the genomic-rescued transgene flies (Del;rescue-1), as well as in old flies carrying a gut targeted expression of *jou*ence compared to their respective control flies (Del,Mex-Gal4>*jou*<sup>1M</sup> and Del,Myo1A-Gal4>*jou*<sup>1M</sup>). In addition, since the expression of *jou*ence (in the deletion background) in the gut is sufficient to rescue and even prevent the hyperplasia, we wonder if the overexpression of *jou*ence in a Wild-Type background could be sufficient to prevent such hyperplasia in WT flies. Figure 5a shows that indeed, such overexpression is sufficient, although to less extent, to prevent the hyperplasia (Mex-Gal4>*jou*<sup>1M</sup> and Myo1A-Gal4>*jou*<sup>1M</sup>).

As the gut is a high-turnover tissue, the number of enterocytes might reflect the proliferative homeostasis of the gut all along the life. To evaluate the origin of this hyperplasia, we quantify the number and the proliferation of the intestinal stem cells (ISCs) as well as the putative mis-differentiation of ISCs daughter cells (enteroblasts: EBs), using different labelling approaches. First, we use the Delta-Gal4 to drive the pUAS-GFP-nls to count the number of ISCs<sup>52</sup>. Figure 5b shows that the number of Delta labelled cells is increased in *jou*-deleted flies. Second, to assess the proliferation of the ISCs, we count the number of anti-PH3 positive cells<sup>46,51</sup>. Interestingly, it reveals (Fig. 5c) a quite similar pattern to the Fig. 5b, indicating that the division of cells follows quite faithfully the number of D1-labelled ISCs. In a step further, to alternatively and independently assess the division of the cells, we use the EdU labelling<sup>53</sup> (a recent updated alternative to BrdU) which labels the dividing as well as the endoreplicative cells. In Fig. 5d we can see that in young flies, the number of EdU labelled cells is increased in *jou*-deleted flies (in accordance to the higher number of endoreplicative ECs), while in aged flies, the number of EdU cells is increased in WT but not statistically different in *jou*-deleted flies, which seems also to reflect quite faithfully the number of D1 positive cells (Fig. 5b). Altogether, these result suggests that the higher number of ECs observed in *jou*-deleted flies result from a higher proliferation of the cells as revealed by the number of D1, anti-PH3 and EdU positive cells.

***jou*ence modulates the endoreplication in enterocytes.** In *Drosophila*, several tissues, as gut, fat body, salivary glands, Malpighian tubules, trachea, muscle and epidermis contain polyploid cells due to endoreplication cycle<sup>54,55</sup>. The ISH has revealed that the snoRNA-*jou*ence is specifically expressed in two endoreplicative cell types, the enterocytes and ovarian nurse-cells, but not in other endoreplicative tissues. Thus, we wonder if the endoreplication is affected in *jou*-deleted flies. We then assess, by two independent and commonly used approaches, the endoreplication in the gut. First, we quantify the amount of DAPI-staining fluorescence of the nucleus, which reflect the quantity of DNA<sup>56</sup>. Figure 5e reveals that the quantity of DNA is reduced in *jou*-deleted flies compared to WT-Controls, indicating less endoreplication. Interestingly, the quantity of DNA (endoreplication) is rescued in flies bearing the genomic-rescued transgene (Del+rescue-1), as well as in deletion flies with a targeted expression of *jou*ence specifically in the gut (Del,Mex-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup>). In a step further, we also quantify the endoreplication in flies overexpressing the snoRNA-*jou*ence in WT genetic background, and more particularly when expressed only in adulthood using the Gene-Switch system. After feeding RU486 to induce the *jou*ence expression, the endoreplication is increased compared to the non-fed RU486 control flies (Mex-GS>*jou*<sup>1M</sup>), indicating that *jou*ence is involved in the control of the polyploidy in ECs. This last result also demonstrates that *jou*ence, among the three snoRNAs of the locus, is



**Fig. 4 Overexpression of *jou* in the enterocytes increases lifespan.** Longevity test results (survival curve – decreasing cumulative) of the targeted expression of *jou* specifically in the enterocytes in Wild-Type genetic background compared to their controls. Myo1A-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup> (**a**) and Mex-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup> (**b**) overexpression in enterocytes is sufficient to increase lifespan. In each longevity panel, Control-1 = Gal4-driver/+, meaning the Gal4 driver without the UAS-construct, while Control-2 = UAS-construct/+, meaning the UAS-*jou*<sup>8M</sup>, or *sno-2*, or *sno-3*, without the Gal4 driver (Notice: same nomenclature for all other overexpression longevity Figures). **c** Overexpression of *jou* only in adulthood is sufficient to increase lifespan (Mex-GS>UAS-*jou*<sup>8M</sup> flies fed with RU486 only in adulthood). **d, e** Overexpression of the *sno-2* (**d**) or *sno-3* (**e**) only in adulthood do not have any effect on lifespan (Mex-GS>UAS-*sno-2* or *sno-3* flies fed with RU486 only in adulthood) (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ) (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed statistics, see Supplementary Information, Table 1).  $p$ -value calculated by log-rank test. **f** RT-qPCR (Taqman) results of the targeted overexpression of *jou* specifically in the enterocytes compared to their controls Myo1A-Gal4, and Mex-Gal4, respectively. Two assay-repetitions were done ( $n = 2$ ) for each genotype. **g** RT-qPCR (Taqman) results of the RU486 induced targeted overexpression of *jou* specifically in the enterocytes only in adulthood in Mex-GS ( $n = 4$ ), compared to the non-induced controls flies ( $n = 7$ ). For **f, g** the *snoRNA-jouvence* is normalized to the level of *rp49*. For each condition, 30 guts were dissected for the total RNA extraction. Statistics: compared to control Myo/CS, or Mex/CS, or to the non-induced Mex-GS: ( $p$ -values) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ). Errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $p$ -value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). For all panels, Source data are provided as a Source Data file.

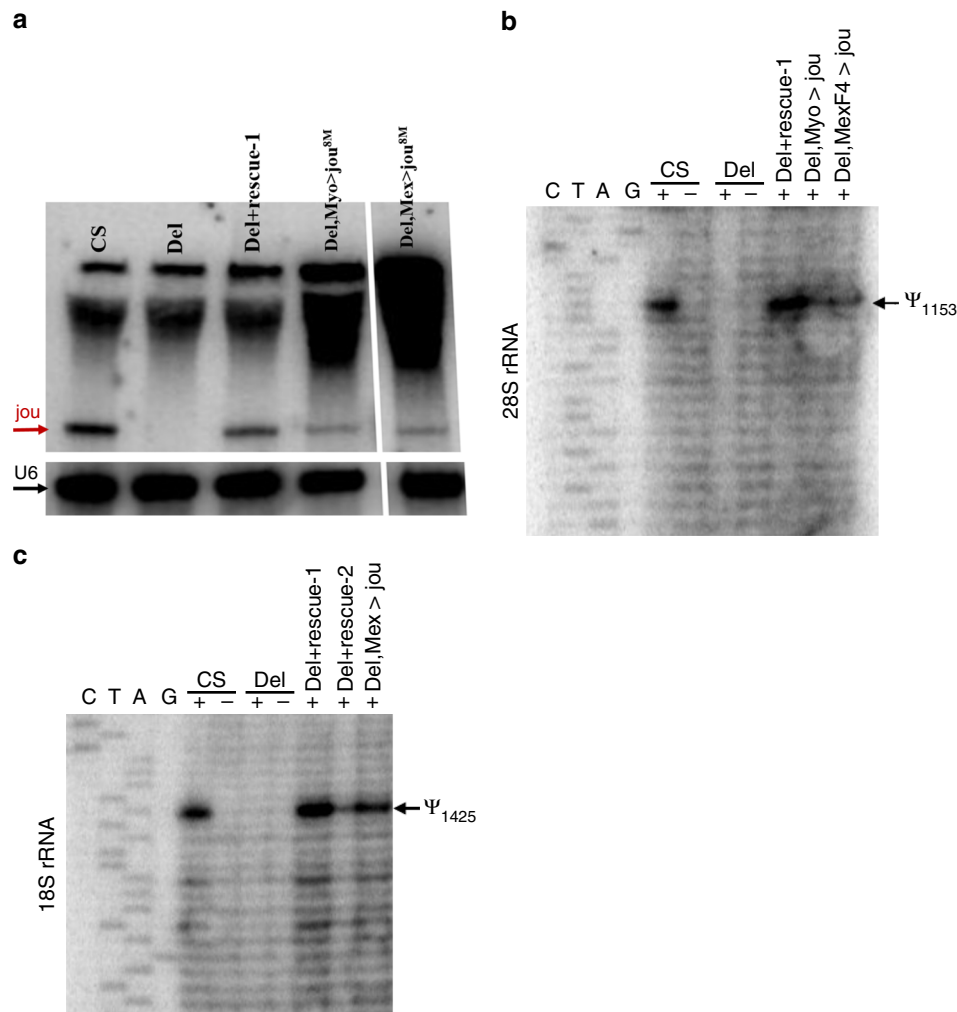


sufficient by itself to modulate the endoreplication. Second, to reinforce such measurement, we also quantify, by RT-qPCR, the Cyclin-E, one of the main genes known to be involved in the endoreplicative cycle<sup>53,56,57</sup> (Fig. 5f). In accordance to the decrease of the amount of DNA quantified by the DAPI-staining,

Cyclin-E RNA expression is decreased in *jou*-deleted flies, a result also supported by the RNA-Seq analysis (see Supplementary Data 2, line 147). Therefore, altogether, these results indicate that the snoRNA *jouvence* is involved in the endoreplication in ECs.



**Fig. 5 Deletion of *jouvence* increases the hyperplasia in old flies.** **a** Number of enterocytes (ECs) in young (7 day-old: light and dark blue) and aged (40-day-old: light and dark red) flies (light = in WT and dark = in deletion). As expected, the number of ECs is increased (hyperplasia) in aged WT flies compared to young (7 day-old) flies. However, this number is more increased in *jou*-deleted flies (dark blue and dark red compared to light blue and light red). Remarkably, the number of ECs is not increased in old genomic-rescued flies (Del;rescue-1), as well as in targeted expression of *jou* in the gut (Del, Myo1A-Gal4>UAS-*jou*<sup>1M</sup> and Del, Mex-Gal4>UAS-*jou*<sup>1M</sup>). Finally, the overexpression of *jou* in WT genetic background prevents the hyperplasia (Myo1A-Gal4>UAS-*jou*<sup>1M</sup> and Mex-Gal4>UAS-*jou*<sup>1M</sup>). **b** The number of DI<sup>+</sup> cells (DI-Gal4>UAS-GFP-nls) in WT control and *jou*-deleted flies. **c** The number of anti-PH3 cells. **d** The number of EdU labelled cells, both in young (blue) and old flies (red). Co-young:  $n = 22$ , Del-young:  $n = 24$ , Co-old:  $n = 31$ , Del-old:  $n = 26$ , Del+rescue-1-old:  $n = 8$ , Mex-GS>*jou*, no RU:  $n = 8$ , with RU:  $n = 7$ . **e** Relative Intensity of DAPI-fluorescence used to evaluate the endoreplication. **a-e** The number at the bottom of each graph represents the number of animals assayed ( $n$ ). **f** RT-qPCR (SybrGreen) performed on the total RNA extracted from the gut on the cyclin-E gene, used to evaluate/quantify the endoreplication. The expression of the cyclin-E is importantly reduced in *jou*-deleted flies ( $n = 4$  for each genotype). Statistics: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ . Errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $p$ -value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). For all panels, Source data are provided as a Source Data file.



**Fig. 6 *Jouvence* is correctly processed and performs the pseudouridylation in vivo.** **a** Northern blot reveals that *jouvence* is correctly processed at approximately 148 nucleotides in WT control flies, missing in deletion line, and rescued in genomic-rescued flies (Del;rescue-1) as well as in gut targeted *jou* (Myo1A-Gal4>*jou*<sup>8M</sup> and Mex-Gal4>*jou*<sup>8M</sup>). U6 used as loading control. **b** The snoRNA-*jouvence* pseudouridylates the 28S-rRNA at position 1153 in WT controls, while it is missing in deletion, and rescued in genomic-rescued flies (Del;rescue-1) as well as in gut targeted *jou* (Myo1A-Gal4>*jou*<sup>8M</sup> and Mex-Gal4>*jou*<sup>8M</sup>). **c** idem for the 18S-rRNA, except that the pseudouridylation occurs at the position 1425. For all panels, Source data are provided as a Source Data file.

***Jouvence* is correctly processed in vivo (northern blot).** Though we have shown by RT-PCR that *jouvence* is expressed in the gut, to provide a more direct measurement of the RNA size and ensures it is correctly processed, we performed northern blots. In Fig. 6, we can observe a band at ~150 nucleotides corresponding to the expected size of *jouvence*, both in control WT as well as in flies carrying either the genomic-rescued transgene (Del+rescue-1) or

in flies with specific targeted expression of *jouvence* in the gut (Del, Myo1A-Gal4>*jou*<sup>8M</sup> and Del, Mex-Gal4>*jou*<sup>8M</sup>).

**The snoRNA-*jouvence* pseudouridylates the rRNA.** According to the reported bioinformatic study in which the snoRNA:Ψ28S-1153 has been primarily annotated<sup>34</sup>, the snoRNA-*jouvence*

(snoRNA:Ψ28S-1153) is predicted to catalyse the modification of a 28S-rRNA base, at position 1153. Based on the tissue-specific expression of *jou*, and to grasp insights into the molecular mechanism of action of *jou*, we check if the rRNA, extracted from the gut, are indeed pseudouridylated. Figure 6b shows, as expected, that the 28S-rRNA is pseudouridylated at position 1153 in WT-Control flies, whereas it is not pseudouridylated in *jou*-deleted flies, indicating that *jou* is required for this site specific pseudouridylation. Moreover, the re-expression of *jou* in *jou*-deleted flies carrying the genomic-rescued transgene (Del+rescue-1) as well as in flies with specific targeted expression of *jou* in the gut (Del,Myo1A-Gal4>*jou*<sup>8M</sup> and Del,Mex-Gal4>*jou*<sup>8M</sup>) demonstrates that the pseudouridylation mechanism is rescued. Additionally, we also show that *jou* pseudouridylates the 18S-rRNA at position 1425 in WT control flies (Fig. 6c), which is absent in *jou*-deleted flies, while it is rescued in genomic-rescued flies (Del+rescue-1 and Del+rescue-2) and gut specific targeted expression (Del,Mex-Gal4>*jou*<sup>8M</sup>).

**Several genes are deregulated in *jou*-deleted flies.** In a step further, to grasp additional insights into the molecular mechanism of action of *jou*, and to better understand *jou* function in longevity we performed a transcriptomic analysis (RNA-Sequencing) of the gut tissue comparing Wild-Type to *jou*-deleted flies. Based on a standard stringency of 2-fold changes, RNA-Seq reveals that 314 genes were upregulated, while 319 genes were downregulated (Fig. 7a, b and Supplementary Data 1, 2). Moreover, a bioinformatic analysis based on KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)<sup>58</sup>, has revealed that 20 pathways are statistically upregulated (Fig. 7c and Supplementary Data 3), the most one being the metabolic pathway, encompassing 55 deregulated genes, while only 6 pathways are downregulated (Fig. 7d and Supplementary Data 4), the most down-deregulated one being the Glutathione metabolic pathway (although this deregulation is less severe). In addition, a Gene Ontology (GO) analysis revealed that the majority of the deregulated genes have a catalytic activity (Supplementary Fig. 7a, b and Supplementary Data 5, 6).

To confirm some of the results obtained by the RNA-Seq analysis, we selected some of the most up- or downregulated genes to perform RT-qPCR on gut tissue. Figure 8 shows that *GstE5* (*Glutathione S transferase E5*), *Gba1a* (*Glucocerebrosidase 1a*), *LysB* (*Lysozyme B*), and *ninaD* (neither inactivation nor afterpotential D) are strongly upregulated in deletion line, whereas CG6296 (lipase and phosphatidylcholine 1-acylhydrolase predicted activities), and *Cyp4p2* (*Cytochrome P450-4p2*) are strongly downregulated, confirming the results of the RNA-Seq. The regulation of these genes by *jou* was confirmed by the analysis of the rescued genotypes. For *GstE5* gene, the level of RNA is rescued in genomic-rescued line (Del+rescue-1) as well as in Myo-Gal4 expressing *jou* in deletion background (Del,Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) specifically in enterocytes. For *Gba1a* and *LysB*, the rescue is quite similar to *GstE5*. However, for the *ninaD*, the regulation seems to be more complex, since the level of RNA is inverted (importantly increased) in genomic-rescued line (Del;rescue-1) and not rescued in Del, Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup> line, suggesting that for this gene the fine regulation of the RNA level is more complex and might putatively involve other factors. For the two selected downregulated genes (CG6296 and *Cyp4p2*), similar to *ninaD*, the regulation seems also to be complex since none of them are rescued by the genomic-rescue line (Del;rescue-1) neither by the Myo1A-Gal4 (Del, Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup>), although it is partially rescued (statistically different) in Del;rescue-1 and Del,Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup> for CG6296. These results suggest that the longevity function of the snoRNA-*jou* relies on its ability to regulate either the mRNA level or the ribosomal RNA stability, or even perhaps the gene expression in the

enterocytes. However, such precise mechanisms remain to be further studied.

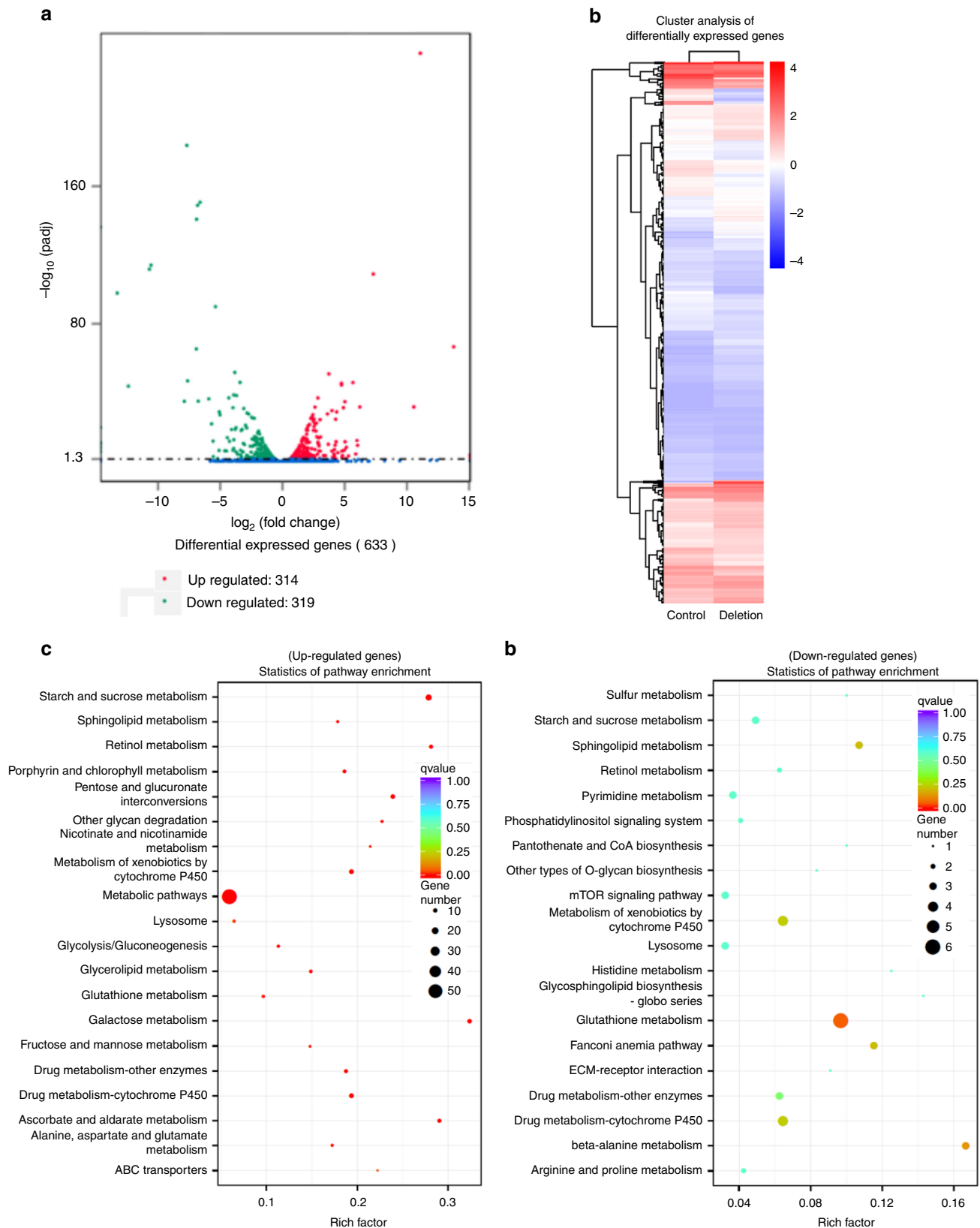
**Overexpression of *jou* deregulates only few genes.** RNA-Seq analysis has revealed that few hundreds of genes are either up- or down-regulated in *jou*-deleted flies, which leads to a shorten lifespan. Inversely, we wonder which genes are modified in flies overexpressing *jou* in a WT genetic background, whose yields to an increase of lifespan. Thus, we performed a second RNA-Seq on the dissected gut of flies expressing conditionally *jou* only in adulthood using the Gene-Switch system (Mex-GS>*jou*<sup>8M</sup>), comparing RU486-fed flies (induced expression) with no-RU486 fed flies (control-non-induced). Surprisingly, it reveals that only 9 genes are deregulated in *jou* overexpressing flies, based on a standard stringency of 2-fold changes (Fig. 9 and Supplementary Data 7). The analysis of pathways enrichment (KEGG analysis)<sup>58</sup> reveals that they are involved principally in the spliceosome and the longevity regulating pathway (Supplementary Data 8), the most upregulated one being the Hsp70Bb gene (Heat-shock-protein-70Bb) (Supplementary Fig. 7c for the GO analysis and Supplementary Data 9).

**Restoring mRNA levels of *ninaD* or CG6296 rescues lifespan.**

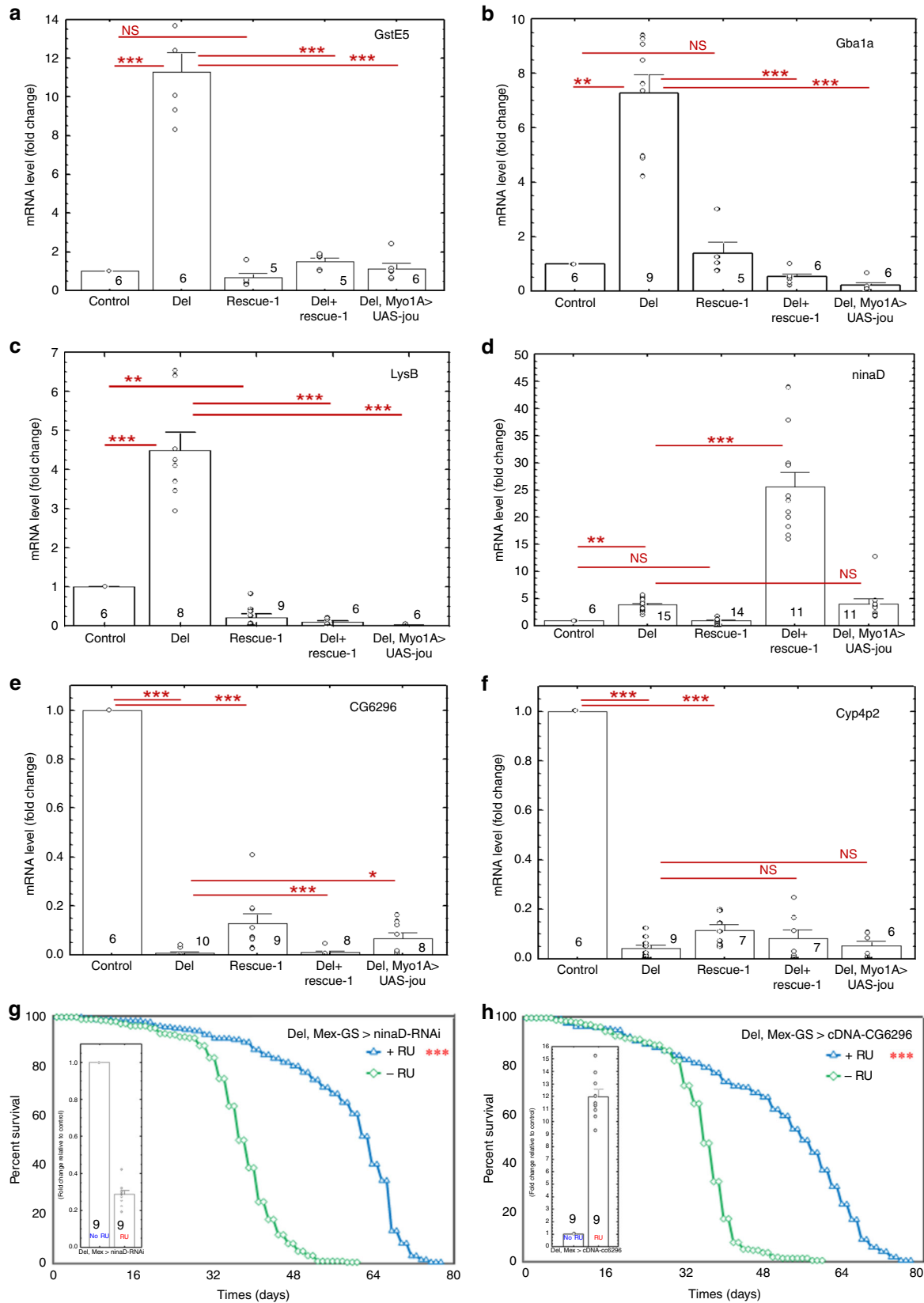
In a step further, to gain downstream mechanistic insights on how the snoRNA *jou* transmits its effect on longevity, we use a genetic approach. First, we select one of the most upregulated genes revealed by the RNA-Seq (*ninaD*), to direct a RNAi, in the aim to decrease and restore its mRNA level. We show that the targeted expression of a *ninaD*-RNAi specifically in the gut, and more precisely only in adulthood (Del,Mex-GS>UAS-*ninaD*-RNAi with and without RU486), is sufficient to importantly decrease and restore the mRNA level (Fig. 8g-inset), and consequently increases (rescue) lifespan (Fig. 8g). Second, inversely, for the CG6296 (one of the most downregulated genes), to restore the level of its transcript, we constructed an UAS-cDNA and a transgenic fly-line. The targeted expression of the cDNA of CG6296 (Del,Mex-GS>pJFRC-MUH-cDNA-CG6396 with and without RU486), specifically in the gut and only in adulthood, restores the level of the mRNA (Fig. 8h-inset), and also leads to an important increase of lifespan. These results highlight a genetic and molecular link between the effect of the snoRNA on ribosomal RNA, some downstream deregulated genes and lifespan.

***Jou* modulates the resistance to various stresses.** Several stress-response genes have been reported to influence lifespan<sup>5,14</sup>. Moreover, several of the deregulated genes of the deletion revealed by the RNA-Seq analysis are also known to be involved in various stress resistances (e.g.: Glutathione and Cytochrome P450 family genes)<sup>59</sup>. Then, we wonder whether *jou* could affect resistance to stress. To elucidate *jou*'s role in stress response, we tested the resistance of transgenic lines (Del+rescue-1 and rescue-1) to desiccation and starvation. During the desiccation test, young flies were placed at 37 °C without water, and their survival time was quantified (Supplementary Fig. 8a). The median survival (50% of dead flies) of control and deletion flies was ~5.5 and ~4.5 h, respectively, showing that the *jou*-deleted flies were less robust. However, rescue-1 flies were more resistant, whereas Del+rescue-1 had similar lifespan as control, indicating that the genomic transgene rescued the resistance to stress. Since transgenic flies lived longer than controls, we also performed the desiccation test in aged (40-days-old) flies (Supplementary Fig. 8b). Similar results were obtained for old flies.

Next, the starvation assay revealed that the median lifespan of control and deletion was ~42 h and ~50 h (30% increase), respectively (Supplementary Fig. 8c). Rescue-1 flies were similar



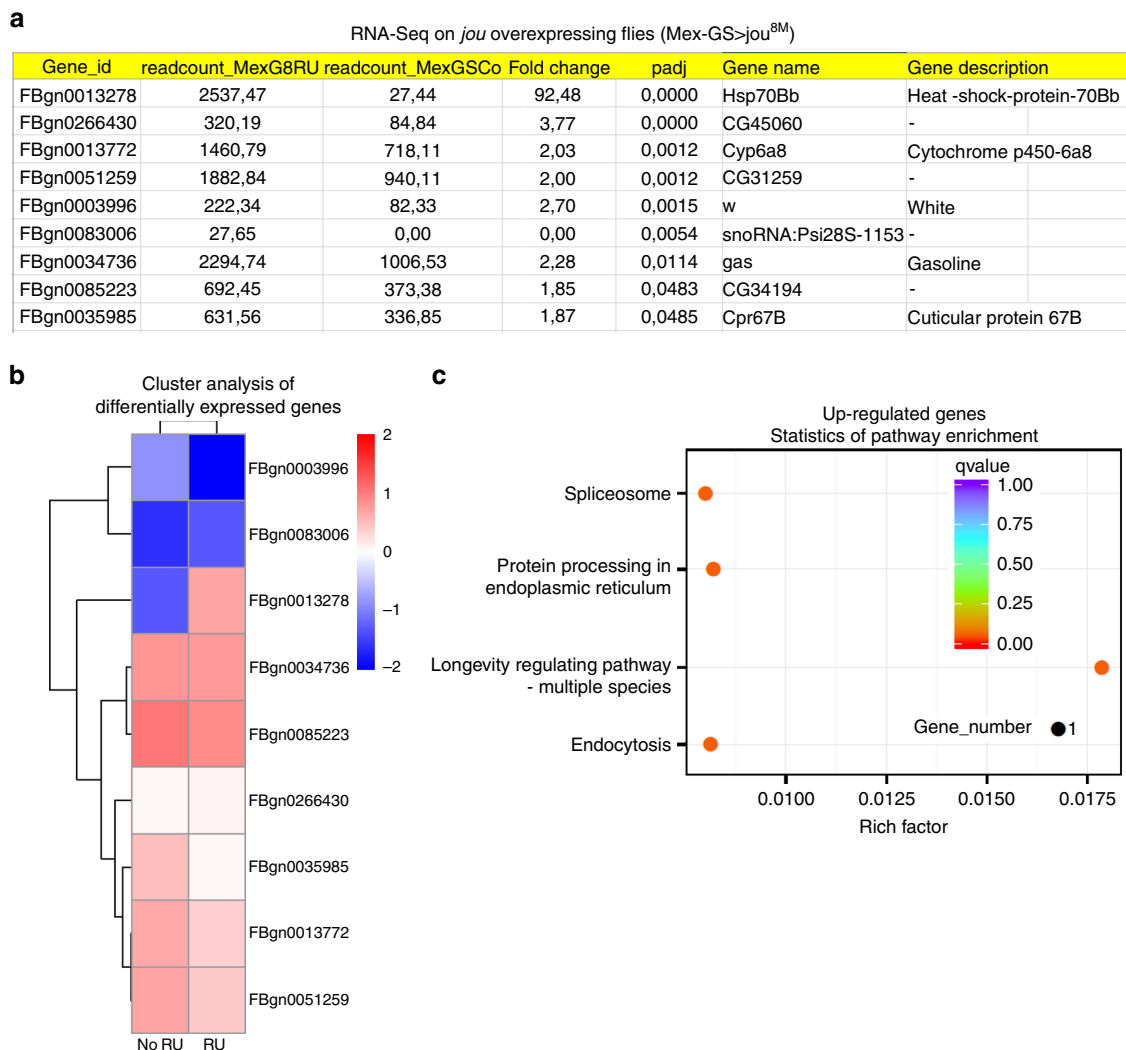
**Fig. 7 RNA-Seq analysis reveals that hundreds of genes are deregulated in deletion.** **a** Transcriptomic analysis (RNA-Seq) performed on total-RNA from the gut reveals that 314 genes are upregulated, while 319 are downregulated, in deletion compared to Control-CS (see Supplementary Data 1 and 2 for the complete list of genes). **b** Clusters analysis (Heat map) of differentially expressed genes. **c, d** Statistics of pathway enrichment of the deregulated genes according to the KEGG analysis<sup>58</sup> (see Supplementary Data 3 and 4 for the full list of the KEGG analysis). In brief, for the upregulated genes (**c**), the metabolic pathways are the main deregulated pathways, while for the downregulated genes (**d**), the glutathione metabolism is the main deregulated pathway (see the Supplementary Data 5 and 6 for the Gene Ontology Analysis).



to control, while Del+rescue-1 had a higher lifespan than control, similar to deletion flies. In old flies, both control and deletion were less robust compared to transgenic overexpression (rescue-1) and Del+rescue-1 line (Supplementary Fig. 8d). These results

showed that *jou* deletion are less robust in desiccation but more robust in starvation in young flies, suggesting that *jou*'s protective role depends on the stress test. However, when *jou* expression was restored in enterocytes under the control of Myo1A-Gal4,

**Fig. 8 RT-qPCR confirms that genes are deregulated in deletion.** RT-qPCR (SybGreen) results of the quantification of the *GstE5*, *Gba1a*, *LysB*, *ninaD*, *CG6296*, and *Cyp4p2* genes in Control (CS), Del (deletion F4), *rescue-1*, *Del+rescue-1*, and *Del,Myo1A>UAS-jou<sup>8M</sup>* in deletion genetic background. In deletion, the mRNA level is increased for *GstE5*, *Gba1a*, *LysB*, and *ninaD* genes, while in contrary it is decreased for *CG6296* and *Cyp4p2*. For the genes *GstE5* (a), *Gba1a* (b), and *LysB* (c), the mRNA level is restored in genomic-rescued transgenic flies *Del+rescue-1* (even it is more than restored in *LysB*), while inversely for *ninaD* (d), the mRNA level is more increased than in deletion. The targeted expression of *jou* specifically in enterocytes (*Del, Myo1A>UAS-jou<sup>8M</sup>*) in deletion is sufficient to restore the level of mRNA for *GstE5*, *Gba1a* and *LysB*, but again here, not for *ninaD*. For the downregulated genes: *CG6296* (e) and *Cyp4p2* (f), none of the transgenic construction (*Del+rescue-1* and *Del,Myo1A>UAS-jou<sup>8M</sup>*) rescues the level of mRNA (although some partial rescued is detectable with *Del,Myo1A>UAS-jou<sup>8M</sup>* for *CG6296*). g, h Longevity test results (survival curve—decreasing cumulative) of the targeted expression of *UAS-ninaD-RNAi* (g) and *UAS-cDNA-CG6296* (h) specifically in the enterocytes in deletion genetic background compared to their controls. Restoring the level of *ninaD* (*Del,Mex-GS>UAS-ninaD-RNAi*) (g) only in adulthood (starting feeding flies with RU486 just after the flies have hatched) nicely increases lifespan compared to the non-RU486 fed control sibling flies). Similarly, restoring the mRNA level of *CG6296* gene (*Del,Mex-GS>UAS-cDNA-CG6296*) (h) and so also only in adulthood, importantly increases lifespan compared to their control sibling flies. (\*\*\* =  $p < 0,001$ ) (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed statistics, see Supplementary Information, Table 1). RT-qPCR performed from the dissected guts of the RU486-induced only in adulthood (*Del,Mex-GS>ninaD-RNAi* or *cDNA-CG6296*), compared to the non-induced controls flies, confirm that the mRNA levels decreased (restored) for *ninaD* (inset g), and increased (restored) for *CG6296* (inset h). For each panel, the level of the analysed gene has been normalized to the level of *rp49*. 30 guts were dissected for the total RNA extraction. The number at the bottom of the box (inside or just above) represents the number of samples (n). Statistics: RU486-induced compared to control non-induced (\*\*\* $p < 0,001$ ). Errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $p$ -value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). For all panels, Source data are provided as a Source Data file.



**Fig. 9 Only few genes are deregulated in flies overexpressing *jou*.** a Transcriptomic analysis (RNA-Seq) performed on total-RNA from the gut of flies overexpressing *jouvence* (*Mex-GS>jou<sup>8M</sup>*), RU486 fed flies (induced) compared to non-induced flies, reveals that only 9 genes are upregulated, while no gene are downregulated. b Clusters analysis (heat map) of differentially expressed genes. c Statistics of pathway enrichment of the deregulated genes according to the KEGG analysis<sup>58</sup> (see Supplementary Data 7-9 for the list of deregulated genes, list of KEGG genes, and Gene Ontology Analysis, respectively).



epithelium of the gut, targeted specific expression of solely *jou* snoRNA in these specific cells, using two independent gut specific P[Gal4] driver lines (Myo1A-Gal4 and Mex-Gal4) and both combined to two independent UAS-*jou* transgenic constructs (UAS-*jou*<sup>8M</sup> and pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>) were sufficient to rescue the longevity in the deletion, and even more precisely, only in adulthood (through the use of the Gene-Switch system) (Mex-GS). Moreover, Northern Blots analysis reveal that *jou* is detected in the gut at the expected size (148 nucleotides), validating its expression and processing. Finally, to extend our general characterization of the snoRNA-*jou*, RT-qPCR have been performed at different developmental stages revealing that *jou* is faintly expressed in all stages, except with a slight stronger expression in the white pupae (Supplementary Fig. 13), a result in agreement with the modENCODE (FlyBase)<sup>35</sup>.

Transcriptomic analysis performed on deletion line has revealed that several (few hundred) genes are deregulated. Several of those genes have been validated by RT-qPCR, while the genetic rescue of *jou* specifically in the enterocytes (Myo1A-Gal4) was sufficient to rescue the mRNA level of several of them, demonstrating that *jou* is the snoRNA responsible for these deregulation. Moreover, among these genes, several are involved in stress resistance. Thus, while deletion line was more sensitive to stress, the rescue of *jou* in deletion increases the resistance to these stress, demonstrating that the presence of *jou* in the gut is sufficient to both increase lifespan and protect against various stress.

However, while our study was ongoing, a general transcriptomic analysis<sup>35</sup> has revealed two other putative snoRNAs, localized just upstream to the snoRNA:Y28S-1153 (*jou*ence). Since the DNA-fragment of 1727 bp used to build the genomic-rescue (rescue-1, 2, 3) also contains these two putative snoRNAs, thus a putative effect of these two snoRNAs could not be excluded. To verify and rule-out that the longevity effect was not due to these two putative snoRNAs, we have targeted the expression of the each of them (sno-2 and sno-3, respectively) in the enterocytes. The expression of the each of these snoRNA individually (in the deletion background) did not rescued or lead to an increase of longevity compared to their co-isogenic control lines, confirming that the longevity effect is due to the snoRNA-*jou*ence.

Our findings indicate that *jou* acts in the fly gut epithelium to promote longevity. In *Drosophila*, a relationship between lifespan and the gut have been previously reported<sup>50,51,60</sup>. In old Wild-Type flies, ISCs over-proliferation causes mis-differentiation of ISC daughter cells, resulting in intestinal hyperplasia: a phenomenon called “hyperproliferative diseases”. Interestingly, preserving hyper-proliferation in the gut epithelium extends lifespan<sup>51</sup>. We have characterized both in control WT and deletion line, and so both in young and old flies, the number of different cell types in the gut. As reported, the number of ECs are increased in old WT flies, confirming a hyperplasia. Whereas, this increase is higher in *jou*-deleted flies, indicating more hyperplasia. However, remarkably, the targeted expression of *jou*ence in the gut, by two independent P[Gal4] driver lines (Del,Myo-Gal4>*jou*<sup>1M</sup> and Del,Mex-Gal4<*jou*<sup>1M</sup>), as well as the overexpression (Myo1A-Gal4>*jou*<sup>1M</sup> and Mex-Gal4<*jou*<sup>1M</sup>) of *jou* prevents this hyperplasia. To point-out more precisely the origin of this hyperplasia, three different and independent quantitative analysis based either on a genetic marker (DI-Gal4>UAS-GPF-nls), or immuno-histological staining (anti-PH3, EdU) have been performed and the labelled cells counted in the overall gut (Fig. 5). The number of ISCs is increased in deletion line (Del) compared to the Control-WT, as well as the number of dividing cells (anti-PH3 and EdU), three results that are consistent with the hyperplasia observed in deletion line. Considered altogether, these

results indicate a higher disruption of the proliferative homeostasis in deletion line, compared to their respective WT controls. More strikingly, the overexpression of *jou* either in deletion line or in the WT genetic background prevents the hyperplasia in old flies. Interestingly, this observation is in accordance with the decrease of the Cyclin E, a marker of the cell cycle, as well as with the decreases of the endoreplication in deletion line. Finally, we also check for the intestinal integrity of the flies, the so called “smurf” flies<sup>11,16,60</sup>, at different ages (7–20 and 40-day-old flies), but we did not notice any significant difference between the Control-WT and the deletion flies (since in all of them, we observe almost no smurf flies, for about 100 flies for each group).

Recently, in *C. elegans*, a link between the nucleolus size and lifespan has been established<sup>61</sup>, a mechanism that has been related to the nucleolar protein fibrillarin. The fibrillarin protein is associated to the RiboNucleoProtein (RNP) of the C/D box snoRNA, whereas the snoRNA *jou*ence belongs to the H/ACA box, which does not involve the fibrillarin. Nevertheless, in some ways, our study extends these findings<sup>61</sup> by specifically identifying a specific cell population (enterocytes) and a specific snoRNA (*jou*ence), reinforcing this previous finding that the nucleolus is involved in the determination of longevity.

Many longevity genes have been shown to modify the resistance to stress tests<sup>5,14</sup>. Interestingly, loss of *jou* function decreases resistance to desiccation, while inversely, the rescue or overexpression of *jou* increased resistance to this stress test. These protective effects are likely due to the increase of the Hsp78Bb gene expression level revealed by the RNA-Seq performed on overexpressing *jou*ence flies, a hypothesis that remain to be tested. However, in response to starvation, the *jou*-dependent resistance was found to be altered depending on the age of the fly (in deletion: it is increased in young flies, but decreased in old flies compared to Control). Such a difference and even opposite effect in resistance to various stress tests has previously been reported<sup>28</sup>, suggesting that the effect on the stress resistance depends rather of the stress test itself rather than being a universal rule of the longevity genes. Indeed, each stress test relies on specific physiological and/or metabolic parameters that might be differently solicited for each stress. Desiccation is mainly an indicator of the water physiology/homeostasis while the starvation is principally an indicator of the energy metabolism (lipids and/or glucose). In addition, since starvation effect of *jou* deletion changes during the adult lifespan (increased in young but reduced in old flies compared to controls), this could suggest that energy metabolic components are modified or altered during the course of the adult life.

To initiate deciphering the molecular mechanism of the snoRNA-*jou*ence, the RNA-Seq and RT-qPCR analyses revealed that several genes are either up- or down-regulated in the deletion line. Interestingly, the first striking outcome of the overview of the 633 differentially expressed genes (Supplementary Data 1–7) reveals that the main components of the most well-characterized pathways involved in longevity, the insulin-signalling pathways (*InR*, *chico*, *FOXO*, etc.), are not strikingly affected, except the *dILP3* (Supplementary Data 2, line 157) which is downregulated in the deletion line, while the *dILP4* (Supplementary Data 1, line 86) is upregulated. These results suggest that *jou* could act through mechanisms or pathways related to longevity, or acts as a more general mechanism to regulate the expression level of several genes. In such a way, the KEGG analysis has revealed that several physiological pathways are affected, the main one being the metabolic pathway with 55 genes (over 924) deregulated. The second striking observation revealed by the RNA-Seq concerns the reported link between the *Myc*/ribosomes biogenesis and lifespan, either in *C. elegans*<sup>62</sup>, *Drosophila*<sup>63</sup>, and mouse<sup>64</sup>. Indeed, it has been reported that several snoRNAs are a class of

Myc targets<sup>65</sup>. However, though this study conducted on S2 cells has identified about 500 Myc target genes, whose function mainly resides in the control of ribosome biogenesis, the snoRNA *jouvence* itself has not been identified in this group of genes regulated by Myc. This result is corroborated by the fact that we did not find any Myc consensus E-box sequence (CACGTG)<sup>65</sup> in the vicinity of the *jouvence* gene (the nearest one being located at 3112 bp in 5'), as well as the Myc gene and the ribosomes biogenesis pathways are not affected in deletion line (see DEG, Supplementary Data 1, 2 and KEGG analysis, Supplementary Data 3). Therefore, this *jou*-independent Myc regulation rather leads to hypothesis that *jouvence* may act, through the pseudouridylation, on ribosomes stability and/or optimize the ribosomes function (which argues for the concept of specialized ribosomes)<sup>66</sup> instead of acting directly on ribosome synthesis.

Moreover, some of these genes have been validated by RT-qPCR. In addition, for some of them (*GstE5*, *Gba1a*, and *LysB*), the level of RNA was rescued by the re-expression of *jouvence* in the enterocytes, demonstrating that *jou* is clearly the snoRNA responsible of this deregulation. However, for some other genes (*ninaD*, *CG6296* and *Cyp4p2*) the deregulation seems to be more complex, either requiring a very precise level of snoRNA-*jou*, or potentially involving the two other putative snoRNAs. To identify and confirm a link between the snoRNA-*jouvence*, the deregulated genes, and the longevity phenotype, we restore in the deletion genetic background, for two of them (*ninaD* and *CG6296*), the level of their transcripts. Remarkably, decreasing the level of *ninaD* (neither inactivation nor afterpotential D) by the expression of a RNAi specifically in the gut, or inversely increasing the level of *CG6296* (a downregulated gene) by the expression of its cDNA, increase lifespan, demonstrating that these two genes, even taken individually, are crucial for the determination of lifespan (Fig. 8). However, these two rescues of longevity is not a systematic rule for all of deregulated genes, since we have also analysed the *Gba1a* gene (Del, Myo-Gal4>UAS-Gba1a-RNAi) (Supplementary Fig. 15), but this last did not restore the longevity of the flies. Interestingly, based on their sequence homology, these two genes are predicted to be involved in lipids and/or cholesterol metabolism. Indeed, *ninaD* encodes a membrane protein homologous to the mammalian class B type I Scavenger receptors, SR-BI. In Mammals, SR-BI play critical roles in cholesterol and high-density lipoproteins (HDL) metabolism and in maintaining plasma cholesterol levels. *CG6296* (a non yet well characterized gene) presents protein domains/motifs similar to triacylglycerol lipase family, with predicted lipase activity and phosphatidylcholine 1-acylhydrolase activity, suggesting a role in lipids metabolism (FlyBase). Taken together, these results indicate that the snoRNA *jouvence* is involved in the fine tuning of the level of many mRNAs. We have demonstrated that *jouvence* pseudouridylates the 28S-rRNA and 18S-rRNA as predicted by its primary sequence<sup>34</sup>, a function restored by the various transgenic lines. Therefore, the snoRNA-*jouvence* might likely act either in the maturation and/or stabilisation of the rRNA, although an involvement in the regulation of the transcription or even potentially in the chromatin structure, as already reported for some other snoRNAs<sup>25</sup> could not at this stage of our study, be excluded. Interestingly, as reported for the methylation of ribosomal RNA by NSUN5, in which the modification of a single rRNA nucleotide yields to functionally different ribosomes<sup>66</sup>, here, the pseudouridylation of a specific base on rRNA ( $\Psi$  at position 1153 on 28S-rRNA) potentially generates a specialized ribosome. Further experiments, as for example, the determination of the 3D structural conformation of the ribosomes (pseudouridylated or not) will be required to answer this precise question. Finally, although it is commonly considered that the snoRNAs might mainly be an ubiquitous and housekeeping machinery in all cells, obviously, as for the methylation of

ribosomal RNA by NSUN5<sup>66</sup>, our results rather argues for a specific snoRNA machinery in certain tissues, as for instance here, in the epithelium of the gut.

Based on its primary sequence (Fig. 10a), *jou* can be classified in the box H/ACA snoRNA<sup>22</sup>. Interestingly in humans, some pathologies have been associated with various snoRNAs. For instance, a mutation in the H/ACA box of the snoRNA of the telomerase (a RNP reverse transcriptase) yields a pleiotropic genetic disease, the congenital dyskeratose, in which patients have shorter telomeres<sup>26,27</sup>. It has also been reported that the snoRNA HBII-52, a human C/D box type of snoRNA, regulates the alternative splicing of the serotonin receptor 2C<sup>67</sup>. Therefore, we speculate that the mammalian *jou* orthologue could play important functions in mouse and human respectively, but it remains to be investigated. Nevertheless, the conservation of sequence and the expression of *jou* raise the exciting hypothesis that similar functions may also be conserved in vertebrates including humans.

Thus, undoubtedly, *jou* represents a good candidate to understand the relationship between the gut, the aging, and the longevity. Interestingly, as already reported, the intestinal cells are very similar in *Drosophila* and mammals, both at cellular and molecular levels<sup>68</sup>, while snoRNAs are well conserved throughout evolution<sup>22</sup>. Although *jouvence* was not yet annotated in the mammalian genome including human, we have shown by two independent and complementary approaches (RT-PCR and Northern Blot) that *jou* is present in mammals and is expressed in the gut (among other tissues), strongly suggesting that it might be functional. Therefore, we could hypothesize that manipulating the mammalian gut epithelium may also protect against deleterious effects of aging and even increase longevity (including in humans). Thus, *jou* snoRNA could represent a promising therapeutic candidate to improve healthy aging.

## Methods

**Flies.** *Drosophila melanogaster* lines were maintained at 24 °C, on our standard dried brewer yeast and cornmeal medium (without sugar or molasses), in a 12 h light/12 h dark cycle. Canton Special (CS) flies were used as Wild-Type control. The deletion (F4) (short named: Del) and the genomic rescue transgenic flies (rescue-1, -2, -3, Del+rescue-1; Del+rescue-2; and Del+rescue-3) were outcrossed a minimum of 6 times with CS (Cantonization) to thoroughly homogenize the genetic background. To follow the deletion (F4) during the Cantonisation (and similar for the Berlinisation), PCR has been performed at each generation to re-identify the fly (chromosome) bearing the mutation (genotyping). The Gal4 lines used (Myo1A-Gal4, Mex-Gal4, esg-Gal4, D1-Gal4, and the generated Mex-GS), as well as the generated transgenic lines (UAS-*jou*<sup>8M</sup>, p-JFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup>, UAS-sno-2, UAS-sno-3) were also backcrossed 6 times with CS (Cantonization). The two Gal4 lines (Myo1A-Gal4 and Mex-Gal4) were then crossed to each of the snoRNA transgenic construct lines to determine their longevity, while in parallel, they were crossed to deletion (F4) to generate the co-isogenic control flies (in such a way, all the tested lines were in heterozygous both for the Gal4 insertion as well as for the UAS-transgene). The lines Myo1A-Gal4 (located on chromosome 2), esg-Gal4 (chromosome 2), were kindly provided by B.A. Edgar, Heidelberg, Germany. The lines Su(H)GBE-Gal4 (chromosome X), and D1-Gal4 (chromosome 3) were a courtesy of X. Zeng, NCI/Frederick, USA. Mex-Gal4 (chromosome 2) was kindly provided by G.H. Thomas, Pennsylvania State Univ., PA, USA. The UAS-*ninaD*-RNAi line (31783R) has been provided from NIG (Japan). This line has also been backcrossed 6 times with CS (Cantonization), and thereafter introduced in the deletion background by standard genetic crosses.

**Determination of the deletion (F4) by PCR.** Two primers located at positions 66851F and 68140R (see Supplementary Information for the sequence of all primers) have been used to amplify the genomic DNA region, both in WT-CS and deletion, to reveal the deletion. The amplicon in CS is 1289 pb, while in deletion is 657 pb. In complement, the deletion has been sequenced. The same two primers have been used to follow the deletion during the Cantonisation and the Berlinisation.

**Construction and genesis of the DNA genomic rescued lines.** The *jou* genomic transgenic lines were generated by PCR amplification of a 1723 bp genomic DNA fragment, using the forward primer (snoRNAgenomic-F) and the reverse primer (snoRNAgenomic-R) (see Supplementary Information for the sequence primers),



both adding a *XbaI* cloning site at the 5'-ends. The amplified fragment was then inserted via the *XbaI* restriction site into the pCaSpeR 4 (which contains no enhancer/promoter sequence). This way, snoRNA expression is dependent on its own genomic regulatory sequences included in the inserted DNA fragment. The transgenic flies were generated by standard transgenic technique (Bestgene, USA), and three lines have been obtained (rescue-1, rescue-2, and rescue-3). Rescue-1 and rescue-2 are inserted on the third chromosome, while the rescue-3 is inserted on the second chromosome.

**Construction and genesis of the Mex-Gene-Switch line.** To generate the Mex-Gene-Switch line, we use the forward primer: Mex1-F + a *SfiI* cloning site at the 5'-ends: 5'-ATAGCCGACGGGCCAACGCGAATTCAGACTGAGC-3', and the reverse primer: Mex1-R + a *SfiI* cloning site: 5'-TGTGGCCCCAGTGGCCCGTTGCACATGGTGTGACT-3', to amplify by PCR using the genomic DNA, a fragment of 2264 bp. Then, this DNA fragment containing the regulatory/promoter sequence of the Mex gene, as formerly reported<sup>47</sup> has been inserted through the *EcoRI* and *DraII* sites into the *pattB-Sf-HS-GALGS* (*SfiI* orientated) (kindly provided by H. Tricoire, Paris). The transgenic flies have been generated by BestGenes (USA), in which the plasmid-construct has been inserted in VK02 site located at position 28E7 on the second chromosome. The Mex-GS transgenic line has been re-introduce in the deletion background by standard genetic cross and recombination.

**Genesis of the UAS-snoRNA lines (*jou*, *sno-2*, *sno-3*).** First, the snoRNA *jou* of 148 bp was cloned into the TOPO-TA cloning vector (Invitrogen) using the same primers used for RT-PCR (see Suppl. Information for snoRNA-Fb and snoRNA-Rb). This construct was also used to synthesize probes for ISH. First, the snoRNA fragment of 148 bp was subcloned into the p[UAST] vector. Second, similarly, the snoRNA fragment of 148 bp was subcloned into the pJFRC-MUH vector<sup>49</sup> (a gift from Gerald Rubin: Addgene plasmid #26213; <http://n2t.net/addgene:26213>; RRID: Addgene\_26213) containing the *attB* insertion sites allowing a directed insertion. Similarly, for the cloning of the DNA fragment containing the *sno-2* or the *sno-3*, appropriated forward and reverse primers (see Supplementary Information) were used to amplify a DNA fragment of 166 bp for the *sno-2*, and 157 bp for the *sno-3*, respectively. Each fragment was then cloned directly into the pJFRC-MUH vector. The transgenic flies were generated (BestGenes, USA). The p[UAS]-*jou*<sup>8M</sup> is inserted randomly on the third chromosome, the pJFRC-MUH-snoRNA-*jou*<sup>1M</sup> construct was inserted into *attP2* site located at position 68A4 on the third chromosome, while the *sno-2*, and the *sno-3* were inserted in VK27 site located at position 89E11 on the third chromosome.

**Construction and genesis of the pJFRC-MUH-cDNA-CG6296.** To generate a Gal4 inducible UAS-cDNA-CG6296, as the framework, we use the CG6296 cDNA cloned in the pOT2 vector (reference: LP07116 from BDGP resources). We then use the forward primer: CG6296F + a *BglII* cloning site at the 5'-ends: 5'-TTCACCTCAACGATGAGATTGAGATCT-3', and the reverse primer: CG6296R + a *XbaI* cloning site: 5'-TCTAGAGGACTTGCAATATTATTTGA-3', to amplify by PCR a fragment of 2167 bp. Then, this cDNA fragment has been inserted through the *BglII* and *XbaI* sites into the pJFRC-MUH vector. The transgenic flies have been generated by BestGenes (USA), in which the plasmid-construct has been inserted in VK27 site located at position 89E11 on the third chromosome. Thereafter, the pJFRC-MUH-cDNA-CG6296 transgenic line has been backcrossed 6 times with CS (Cantonization), and then introduced in the deletion background by standard genetic crosses.

**Detection of *jou* by RT-PCR in *Drosophila*, mouse and human.** For *Drosophila*, total RNA from whole female flies was extracted by standard procedures using Trizol (Invitrogen). This was treated with RQ1 RNase free DNase (Promega) to remove any DNA contamination, and verified by PCR. Following this, RT was performed with MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) using a random primer hexamer (Promega), followed by a 20-min RNase H (Invitrogen) at 37 °C. The PCR was performed using forward and reverse primers (for primer sequences, see Supplementary Information), with Taq DNA Polymerase (Invitrogen), at 51.4 °C. Similar procedures were used to amplify the 300 bp control RP49 fragment using the forward and reverse primers respectively. Mouse and human total RNA were commercially purchased at Amsbio: Mouse Brain, whole Total RNA: MR-201, Mouse Ovary Total RNA: MR-406, Mouse Kidney Total RNA: MR-901, Human Brain Total RNA: HR-201, Human Ovary Total RNA: HR-406, Human Kidney Total RNA: HR-901. The human gut RNA was purchased at Biochain: Human adult Normal small Intestine Total RNA: T1234226. All of these total RNA were re-treated by the DNase to completely remove the DNA, and re-verified by PCR before performing the RT-PCR. Thereafter, RT-PCR have been performed in similar conditions as for *Drosophila*. For the sequence primers, see Supplementary Information.

**Quantification of genes expression by RT-PCR.** For *Drosophila*, total RNA were extracted from 30 dissected gut as described above for the detection of *jou* expression, followed by RT-PCR. For the *Drosophila* Cyclin-E, see Supplementary Information for the primers used. rp49 was used as normalization. For the mouse

and human RT-PCR, we use the same total RNAs as for the *jou* orthologue detection (see above). For the TEAD1 (human), CNNT and EPC1 (mouse), see Supplementary Information for the primers used. Human and mouse 18S-rRNA were used as normalization, accordingly. All the genes expression were performed by RT-qPCR using SybrGreen probes.

**Quantitative PCR (qPCR) by Taqman.** For RNA extraction of whole flies or dissected gut, similar procedures described above for RT-PCR were used. The samples were diluted in a series of 1/5, 1/10, 1/100 to establish the standard curve, then 1/100 was used for the internal control (RP49) and 1/5 for *jou*. The TaqMan Universal Master Mix II, no UNG was used with a specific Taqman probe designed for the snoRNA *jou* and a commercial Taqman probe for RP49 (catalogue number: 4331182, ThermoFisher™). The amplification was done in a BioRad apparatus (Biorad CFX96) with a program set at: activation 95 °C, 10 min, PCR 40 cycles: 95 °C, 15s, 60 °C, 1 min. Then, the ratio of the snoRNA (dilution 1/5) was reported to the RP49 (dilution 1/100 - since the RP49 is more expressed) and then calculated and normalised to CS = 1. Taqman RT-qPCR was performed in duplicate on each of 3 or 5 independent biological replicates, depending of the genotype. All results are presented as means ± S.E.M. of the biological replicates.

**In situ hybridization (ISH) and histological preparation.** For whole flies ISH, we used 5 day-old females. On day-1 (d1), whole flies were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 6 h at 4 °C, and then incubated overnight in 25% sucrose solution at 4 °C. On d2, individual flies were embedded in 20% carboxymethylcellulose, frozen in liquid nitrogen, and sectioned using a Cryostat (-20 °C) at 30 µm thickness. The sections were rehydrated for 15 min in PBS-1X + 0.1% Tween-20, and post-fixed with 4% PFA for 15 min. They were washed twice with PBS-1X + 0.1% Tween-20, and treated with Proteinase-K (10 µg/ml) for 5 min. Proteinase-K was inactivated using glycine (2 mg/ml) and the sections were washed and post-fixed again. For ISH, the fixed sections were washed with hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 100 µg/ml heparin, 100 µg/ml of salmon sperm DNA, 0.1% Tween-20) diluted with PBS (1/1) followed by pre-hybridization for 1 h at 65 °C using the same hybridization buffer. Overnight hybridization with the snoRNA anti-sense probe (or sense as negative control) was performed at 45 °C. The sense and anti-sense probes were synthesized using the DIG RNA labelling kit (SP6 or T7) (Roche™). On d3, the sections were washed four times at 45 °C: 3/0 - 3/1 - 1/1 - 1/3 with hybridization buffer/PBS, 15 min each wash. Sections were then washed four times with PBS 1X 0.1% tween, 5 min at RT, and PBS 1X 0.1% tween + 10% goat serum, 1 h, followed by the incubation with the primary antibody, anti-Digoxigenin-mouse-HRP conjugate at 1/100 (reference: NEF832001EA, Perkin Elmer) for 1 h, RT. The immuno-reaction was amplified with the tyramide amplification kit (TSA cyanine 3 plus Evaluation kit—Perkin Elmer) for 8 min in the dark; the sections were washed as usual and counter-stained with DAPI (Roche) for 5 min. The preparation was mounted with Mowiol. For double labelling, following tyramide signal amplification, the sections were incubated with goat serum 2% in PBS 1X 0.1% Tween-20, for 2 h at RT, and incubated with anti-GFP at 1/500 (reference: 11-814-460-001, Roche), overnight. On d4, the slides were washed, and incubated with the secondary antibody, anti-mouse FITC at 1/500 (F-6257, Sigma), washed as usual, and mounted with Mowiol. Same protocol has been used for the ISH on dissected gut, except that we use a FITC-labelled tyramide instead of a Cy3-labelled tyramide.

**Northern blot.** Total RNAs from the different genotypes were extracted from the dissected gut with TRIZOL reagent following the supplier's instructions (Invitrogen). Denatured RNA samples were run for 1 h on precasted (10 × 10 cm) TBE urea 10% acrylamide gel (Biorad). We use, for *Drosophila*, 10 µg of total RNA, and for mouse, 15 µg of total RNA extracted from the gut. The RNA were then transferred to Hybond N+ membranes (Amersham) and then pre-hybridized for 4 h in 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt, 50 mM sodium phosphate pH 7.5, and 0.1% SDS (w/vol), and 100 µg ml<sup>-1</sup> of denatured DNA from salmon sperm, before an overnight hybridization under the same conditions. Pre-hybridization and hybridization were carried out at 42 °C. The day after, the membrane were washed as follows: a spontaneous wash with 4X SSC during 5 min at RT, followed by three successive washes of 4X SSC, 0.1% SDS, 1X with 1X SSC, 0.1% SDS, and finally 1X with 0.5X SSC, 0.1% SDS, each during 20 min at 60 °C. Membranes were then subjected to phosphorimager analysis using a Typhoon Trio Imaging System (GE Healthcare) for 2 h. For the P<sup>32</sup> labelled RNA probes, first, the DNA fragment for each probe (*Drosophila jou* and U6, mouse snoRNA-18 and U6) were cloned in the TOPO-TA Cloning plasmid vector (Invitrogen). Then, according to the sens of the cloning, the 3' end of each probe were cut with the appropriated restriction enzyme. Thereafter, the transcription of the probe in presence of α-P<sup>32</sup> UTP were synthesized using either SP6 or T7 RNA polymerase. Finally, the probes were purified on Sephadex spin-column. In a second step, Blots were re-probed with U6 as a loading control.

**Pseudouridylation.** Total RNAs from the different genotypes were extracted from the dissected gut with the SV Total RNA Isolation System Kit (Z3100, Promega), followed by a DNase-1 treatment (30 min at 37 °C) to completely remove any DNA trace. Then the total RNA were purified with the NucleoSpin RNA Clean-up kit

(740948.50, Macherey-Nagel), and the concentration determined. For pseudouridylation experiments, we follow the protocol of Huang et al. (2016)<sup>69</sup>. Dried total RNA (10 µg for each reaction) were treated with (or without for control) N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluenesulphonate (CMC) for 30 min at 40 °C, and subjected to alkali hydrolysis in the presence of 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10.4) at 50 °C during 2 h with shaking every 10 min. The 50mers of each probes (18S and 28S-rRNA) were radiolabelled using the T4 Polynucleotides Kinases (T4-PNK) and γ-P<sup>32</sup>-ATP. The 20 mers primers (see Supplementary Materials for the sequences) were designed about 50 nucleotides downstream to the predicted sites of pseudouridylation. The Reverse Transcription reactions were then performed on the 18S and 28S-rRNA templates respectively. In meantime, the DNA templates of the 18S and 28S-rRNA were generated by PCR using two primers located about 200 nucleotides upstream and downstream to the predicted pseudouridylation sites (a fragment of about 400 bp) (see Suppl. Materials for the sequences). For the sequencing of the DNA used as reference, we used the Sanger method and the Sequenase Kit (USB, Life Technologies), with slight modifications, notably because we used γ-P<sup>32</sup> 5'-labelled primers (the same as for the pseudouridylation reaction) instead of labelled nucleotides. Then, both reactions were migrated in parallel on an 8% acrylamide gel + 8 M urea, at 2000 volts during 2 h. After drying, the gels were then subjected to phosphorimager analysis using a Typhoon Trio Imaging System (GE Healthcare) for 2 h.

**Determination of the cells number of different cell types.** First, to determine the number of cells of the different cell types, the gut were dissected in PBS and then fixed in 4% PFA for one hour, followed by 3 washes with PBS and then stained with DAPI for 5 min, and finally mounted in Mowiol. To determine the number of ECs, we count the total number of nucleus stained with DAPI on microscope images taken on two distinct areas of a 33,000 µm<sup>2</sup> in the posterior midgut. The displayed data represent the means of these two distinct areas. Second, the number of each other specific cell types were counted on the whole gut. We used appropriated genetic markers: for the ISCs, we use D1-Gal4 driving the UAS-GFP-nls (nls = nuclear localization sequence). For the dividing cells, we use two independent approaches (EdU and anti-PH3). For the EdU labelling, the guts were dissected in the PBS and incubated for 1 h in EdU solution (20 µM) at 25 °C (according to the protocol of Lilly and Spradling, 1996)<sup>53</sup>, using the Click-iT Reaction Imaging Kit (C10086, Molecular Probes). The gut were then mounted in Mowiol and examined to the microscope. For the anti-phospho Histone-H3 (anti-PH3) immunostaining, the guts were dissected in the PBS and fixed for 1 h in 4% PFA. Then washed 3 times in PBST (PBS + 0,1% Triton), followed by 4 h incubation in PBST, and then with the primary antibody (polyclonal anti-phospho-Histone-3 done on rabbit) at 1/2000 (EMD-Milipore, #06-570) overnight at 4 °C. The day after, the gut were washed 3 times, followed by one hour incubation with the secondary antibody (goat anti-rabbit-Alexa488) at 1/400 (A11304, Invitrogen) at RT, then re-washed again 3 time with PBST and then mounted in Mowiol.

**Quantification of endoreplication.** To quantify the endoreplication of the enterocytes, we used the same fixation protocol as to count the number of enterocytes, except that we precociously and strictly quantify the DAPI-fluorescence according to Weiss et al., 1998<sup>56</sup>.

**Longevity.** Following amplification, flies were harvested on one day. Female flies were maintained with males in fresh food vials for 4 days. On day 4, females were separated from males, and distributed in a cage holding between 200 and 250 females. The cage (50 mm diameter × 100 mm high) is made of plexiglass. The top is covered by a mesh, while the bottom (floor) is closed by a petri dish containing the food medium. The petri dish was replaced every 2 days, and the number of dead flies counted. Note: The lifespan determination of each group of flies and their respective controls (genotypes) have been performed simultaneously, strictly in parallel. Moreover, all longevity experiments have been repeated 2 or 3 times independently.

**Stress resistance tests.** For starvation test, female flies were maintained with males in fresh food vials for 4 days, before testing. On day 4, females were separated from males, and distributed in vials containing 20 females each. Each vial contained a filter, and cotton moisturized with 200 µl of water, to keep the filter moist during the test. The flies were kept at 24 °C in a humid chamber, to avoid dehydration. Dead flies were counted every 12 h.

For desiccation test, flies were reared at 25 °C, as usual. Then, female flies were maintained with males in fresh food vials for 4 days, at 25 °C, before testing. On day 4, females were separated from males, and distributed in empty glass vials containing 20 females each, without any filter paper. The vials were transferred and tested at 37 °C, for young flies. However, since 40-day-old flies die rapidly at 37 °C precluding a clear differentiation of the various genotypes, the stress test assay was performed at 30 °C, a milder stress condition. Dead flies were counted every hour.

**Transcriptomic analysis (RNA-sequencing).** For RNA extraction, each single hand-dissected gut was immediately soaked in liquid nitrogen and keep at -80 °C. 30 guts were dissected for each genotype. RNA extraction was performed with SV Total RNA Isolation kit (Wizard Purification, Promega) following standard

procedures provided by the manufacturer. Thereafter, the total RNA was treated with RQ1 RNase free DNase (Promega) to remove any DNA contamination, and verified by PCR. Then, total RNA were checked for integrity on a bioanalyzer (Agilent). PolyA RNA-Seq libraries were constructed using the Truseq mRNA stranded kit (Illumina) according to the manufacturer recommendations. Libraries were sequenced (Single Read 75 pb) on an Illumina NextSeq500 instrument, using a NextSeq 500 High Output 75 cycles kit. Demultiplexing has been done (bc2fastq2 V2.15.0) and adapters removed (Cutadapt1.9.1). Reads have been mapped on the *D. melanogaster* genome (dmel-all-chromosome-r6.13.fasta) with TopHat2. Mapped reads were assigned to features with featureCounts 1.5.0-p2 and differential analysis has been done with DESeq2. Three independent biological replicates have been done for each genotype. For the Wild-Type CS and deletion (F4), the RNA-Seq has been performed in the Platform of the I2BC, CNRS, Gif-sur-Yvette, followed by a Bioinformatic analysis performed by Novogene Co (Beijing, China). For the overexpression of *juvence* (Mex-GS>UAS-jou<sup>8M</sup>) flies induced by feeding with RU486 (during 7 days) have been compared to non-induced flies (without RU486 feeding). For this last, the complete RNA-Seq analysis (Sequencing and Bioinformatic analysis) has been performed by Novogene.

**Quantitative and statistical analysis.** For the longevity and stress resistance survival curves, log-ranks test was performed using the freely available OASIS software (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/>)<sup>70</sup>. For the qPCR, and the quantification of number of different intestinal cells, data were analysed statistically using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by a TUKEY test, with Statistica<sup>TM</sup> software.

We declare to have complied with all the relevant ethical regulations for animal testing and research.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The authors declare that all the data and the methods used in this study are available within this article, its Supplementary Information files, its Supplementary Data, its Source Data File, or are available from the corresponding authors upon reasonable request. The RNA-Sequencing Data have been deposited at NCBI with the BioSample accession number: PRJNA594829.

Received: 23 May 2018; Accepted: 31 January 2020;

Published online: 20 February 2020

## References

- Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* **328**, 321–326 (2010).
- Niccoli, T. & Partridge, L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr. Biol.* **22**, R741–R752 (2012).
- Kennedy, B. K., Austriaco, N. R. Jr., Zhang, J. & Guarente, L. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**, 485–496 (1995).
- Kaerberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).
- Lin, Y. J., Seroude, L. & Benzer, S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* **282**, 943–946 (1998).
- Clancy, D. J. et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292**, 104–106 (2001).
- Tatar, M. et al. A mutant *Drosophila* Insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**, 107–110 (2001).
- Bai, H., Kang, P. & Tatar, M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* **11**, 978–985 (2012).
- Sun, J. & Tower, J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol. Cell Biol.* **19**, 216–228 (1999).
- Whitaker, R. et al. Increased expression of *Drosophila* Sir 2 extends life span in a dose-dependent manner. *Aging* **5**, 682–691 (2013).
- Rera, M. et al. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab.* **14**, 623–634 (2011).
- Copeland, J. M. et al. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr. Biol.* **19**, 1591–1598 (2009).
- Skorupa, D. A., Dervisevic, A., Zwiener, J. & Pletcher, S. D. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **7**, 478–490 (2008).
- Vermeulen, C. J. & Loeschcke, V. Longevity and the stress response in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **42**, 153–159 (2007).

15. Bolukbasi, E. et al. Intestinal fork head regulates nutrient absorption and promotes longevity. *Cell Rep.* **21**, 641–653 (2017).
16. Filer, D. et al. RNA polymerase III limits longevity downstream of TORC1. *Nature* **552**, 263–267 (2017).
17. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504–512 (2010).
18. Chen, Y. F., Wu, C. Y., Kao, C. H. & Tsai, T. F. Longevity and lifespan control in mammals: lessons from the mouse. *Ageing Res. Rev. Suppl* **1**, S28–S35 (2010).
19. Eacker, S. M., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Understanding microRNAs in neuro-degeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 837–741 (2009).
20. Liu, N. et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **482**, 519–523 (2012).
21. Kato, M. & Slack, F. J. Ageing and the small, non-coding RNA world. *Ageing Res. Rev.* **12**, 429–435 (2013).
22. Kiss, T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**, 145–148 (2002).
23. Ye, K. H/ACA guide RNAs, proteins and complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 287–292 (2007).
24. Carlile, T. M. et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* **515**, 143–146 (2014).
25. McMahon, M., Contreras, A. & Ruggero, D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**, 173–189 (2015).
26. Mitchell, J. R., Wood, E. & Collins, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**, 551–555 (1999).
27. Vulliamy, T. et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**, 432–435 (2001).
28. Grotewiel, M. S., Martin, I., Bhandari, P. & Cook-Wiens, E. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res. Rev.* **4**, 372–397 (2005).
29. Jones, M. A. & Grotewiel, M. *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors. *Exp. Gerontol.* **46**, 320–325 (2001).
30. Martin, J. R., Ernst, R. & Heisenberg, M. Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **184**, 73–84 (1999).
31. Martin, J. R., Raabe, T. & Heisenberg, M. Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **185**, 277–288 (1999).
32. Martin, J. R., Faure, F. & Ernst, R. The power law distribution for walking-time intervals correlates with the ellipsoid-body in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **15**, 1–15 (2002).
33. Brody, T., Stivers, C., Nagle, J. & Odenwald, W. F. Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech. Dev.* **3**, 41–59 (2002).
34. Huang, Z. P. et al. Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs. *RNA* **11**, 1303–1316 (2005).
35. Graveley, B. R. et al. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 473–479 (2011).
36. Roberts, D. B. & *Drosophila*, A. *Practical Approach*. (IRL Press, Oxford University Press, Oxford, U.K., 1998).
37. Brand, A. H., Manoukian, A. S. & Perrimon, N. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* **44**, 635–654 (1994).
38. Regan, J. C. et al. Sex difference in pathology of the ageing gut mediates the greater response of female lifespan to dietary restriction. *Elife* **5**, e10956 (2016).
39. Tower, J. Sex-specific gene expression and life span regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 735–747 (2017).
40. Austad, S. N. & Fischer, K. E. Sex differences in lifespan. *Cell Metab.* **23**, 1022–1033 (2016).
41. Micchelli, C. A. & Perrimon, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* **439**, 475–479 (2006).
42. Ohlstein, B. & Spradling, A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439**, 470–474 (2006).
43. Jiang, H. & Edgar, B. A. Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp. Cell Res.* **317**, 2780–2788 (2011).
44. Zeng, X., Chauhan, C. & Hou, S. X. Characterization of midgut stem cell- and enteroblast-specific Gal4 lines in *Drosophila*. *Genesis* **48**, 607–611 (2010).
45. Morgan, N. S., Skovronsky, D. M., Artavanis-Tsakonas, S. & Mooseker, M. S. The molecular cloning and characterization of *Drosophila melanogaster* myosin-IA and myosin-IB. *J. Mol. Biol.* **239**, 347–356 (1994).
46. Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., McEwen, D. G. & Edgar, B. A. Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* **137**, 1343–1355 (2009).
47. Phillips, M. D. & Thomas, G. H. Brush border spectrin is required for early endosome recycling in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **119**, 1361–1370 (2006).
48. Dutta, D. et al. Regional cell-specific transcriptome mapping reveals regulatory complexity in the adult *Drosophila* midgut. *Cell Rep.* **12**, 346–358 (2015).
49. Pfeiffer, B. D. et al. Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **6**, 735–755 (2010).
50. Biteau, B., Hochmuth, C. E. & Jasper, H. JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* **3**, 442–455 (2008).
51. Biteau, B. et al. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **6**, e1001159 (2010).
52. Perdigoto, C. N., Schweisguth, F. & Bardin, A. J. Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* **138**, 4585–4595 (2011).
53. Lilly, M. A. & Spradling, A. C. The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. *Genes Dev.* **10**, 2514–2526 (1996).
54. Britton, J. S. & Edgar, B. A. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* **125**, 2149–2158 (1998).
55. Edgar, B. A. & Orr-Weaver, T. L. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297–306 (2001).
56. Weiss, A., Herzig, A., Jacobs, H. & Lehner, C. F. Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **8**, 239–242 (1998).
57. Knoblich, J. A. et al. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107–120 (1994).
58. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **45**, D353–D361 (2017).
59. Girardot, F., Monnier, V. & Tricoire, H. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **5**, 74 (2004).
60. Rera, M., Clark, R. I. & Walker, D. W. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 21528–21533 (2012).
61. Tiku, V. et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat. Commun.* **8**, 16083 (2017).
62. Johnson, D. W. et al. The *Caenorhabditis elegans* Myc-Mondo/Mad complexes integrate diverse longevity signals. *PLoS Genet.* **10**, e1004278 (2014).
63. Greer, E. K. et al. Myc-dependent genome instability and lifespan in *Drosophila*. *PLoS One* **8**, e74641 (2013).
64. Hofmann, J. W. et al. Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell* **160**, 477–488 (2015).
65. Herter, E. K. et al. snoRNAs are a novel class of biologically relevant Myc targets. *BMC Biol.* **13**, 25 (2015).
66. Schosserer, M. et al. Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan. *Nat. Commun.* **6**, 6158 (2015).
67. Kishore, S. & Stamm, S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* **311**, 230–232 (2006).
68. Casali, A. & Batlle, E. Intestinal stem cells in mammals and *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **4**, 124–127 (2009).
69. Huang, C., Karjilovich, J. & Yu, Y. T. Detection and quantification of RNA 2'-O-methylation and pseudouridylation. *Methods* **103**, 68–76 (2016).
70. Yang, J. S. et al. OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PLoS ONE* **6**, e23525 (2011).

## Acknowledgements

We thank E. Heard for her help with the search of the mammalian orthologue sequences. F. Rouyer (NeuroPSI, Gif-sur-Yvette), A. Molla-Herman, J.R. Huynh, and more especially A. Bardin (Institut Curie, Paris) for their helpful comments and critical reading of the paper. B.A. Edgar (Heidelberg, Germany), X. Zeng (NCI/Frederick, USA), and G.H. Thomas (Penn. State Univ., USA) for the gut-Gal4 lines, H. Tricoire for the pattB-Sf-HS-GALGS (Gene-Switch vector), and M.N. Soler from Imagif CNRS for her assistance with confocal microscopy. We also thank M. Betermier and her Team (CNRS, I2BC, Gif-sur-Yvette) for the loan of sequencing/pseudouridylation materials. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Centre de Recherche de Gif - <http://www.i2bc-saclay.fr/>). The English language of the preliminary version of this paper has been edited by ASK Scientific Ltd, Cambridge, UK, and by A. Bardin for the last version. This work was supported by the CNRS France to J.R. Martin.

## Author contributions

J.R.M. conceived and designed the experiments. J.R.M., S.S., L.M. and K.A. performed *Drosophila* experiments and analysed data. C.C. performed bioinformatics search of *jou* orthologues. J.R.M. wrote the paper with input from all authors.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

**Additional information**

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14784-1>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.-R.M.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

# SUPPLEMENTARY INFORMATION

## ***jouvence* a new small nucleolar RNA required in the gut extends lifespan in *Drosophila***

Stéphanie Soulé<sup>1#</sup>, Lucille Mellottée<sup>1#</sup>, Abdelkrim Arab<sup>1</sup>,

Chongjian Chen<sup>2</sup>, and Jean-René Martin<sup>1\*</sup>

(1) Equipe: Imagerie Cérébrale Fonctionnelle et Comportements (ICFC),

Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI)

UMR-9197, CNRS/Université Paris Sud,

1 Avenue de la Terrasse (Bat. 32/33)

91198, Gif-sur-Yvette, France

Tel: (33) 01.69.82.41.80 / Fax: (33) 01.69.82.34.47

(1\*) corresponding author: Jean-René Martin: e-mail: jean-rene.martin@inaf.cnrs-gif.fr

# : these authors contribute equally to this work.

Supplementary Table 1 (Statistic of Longevity)

Name	n	Age in days at % mortality					Statistics	
		25%	50%	75%	90%	100%	Condition	P-value
<b>in Deletion-F4</b>								
Control (CS)	287	34,0	40,0	44,0	50,0	56,0	Control (CS) v.s. Del (Deletion-F4)	0,000
Del (Deletion-F4)	302	28,0	34,0	36,0	44,0	58,0	Control (CS) v.s. Del+rescue-1	0,154
Del+rescue-1	173	32,0	40,0	44,0	48,0	52,0	Control (CS) v.s. rescue-1	0,000
rescue-1	259	41,0	45,0	49,0	55,0	63,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-1	0,000
Del (Deletion-F4)	218	30,0	32,0	36,0	36,0	38,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-2	0,000
Del+rescue-2	138	34,0	44,0	50,0	52,0	54,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-3	0,000
Del+rescue-3	170	41,0	45,0	47,0	51,0	55,0		
Del,Myo1A>UAS-jou (rescued)	104	59,0	64,0	71,0	71,0	76,0	Del,Myo1A/UAS-jou v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
Control-1 (Del,Myo1A/Del)	111	49,0	56,0	60,0	63,0	63,0	Del,Myo1A/UAS-jou v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,000
Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	112	49,0	53,0	56,0	63,0	64,0		
Del,Myo1A>UAS-sno-2	216	42,0	46,0	50,0	54,0	54,0	Del,Myo1A/UAS-sno-2 v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
Control-1 (Del,Myo1A/Del)	241	41,0	49,0	53,0	55,0	59,0	Del,Myo1A/UAS-sno-2 v.s. Control-2 (Del,UAS-sno-2/Del)	0,000
Control-2 (Del,UAS-sno-2/Del)	242	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0		
Del,Myo1A>UAS-sno-3	235	40,0	44,0	46,0	50,0	52,0	Del,Myo1A/UAS-sno-3 v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
Control-1 (Del,Myo1A/Del)	241	41,0	49,0	53,0	55,0	59,0	Del,Myo1A/UAS-sno-3 v.s. Control-2 (Del,UAS-sno3/Del)	0,000
Control-2 (Del,UAS-sno3/Del)	231	28,0	34,0	36,0	38,0	42,0		
Del,Mex>UAS-jou (rescued)	98	55,0	63,0	67,0	71,0	71,0	Del,Mex/UAS-jou v.s. Control-1 (Del,Mex/Del)	0,000
Control-1 (Del,Mex/Del)	124	47,0	53,0	59,0	63,0	63,0	Del,Mex/UAS-jou v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,000
Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	112	49,0	53,0	56,0	63,0	64,0		
Del,Mex-GS>UAS-jou (RU)	198	56,0	58,0	62,0	64,0	70,0	Del,Mex-GS/jou (RU) v.s. Del,Mex-GS/jou (No RU)	0,000
Del,Mex-GS>UAS-jou (No RU)	212	48,0	50,0	54,0	58,0	64,0		
Del,Mex-GS>UAS-sno2 (RU)	66	29,0	33,0	37,0	39,0	43,0	Del,Mex-GS/sno2 (RU) v.s. Del,Mex-GS/sno2 (No RU)	0,000
Del,Mex-GS>UAS-sno2 (No RU)	101	34,0	36,0	38,0	40,0	46,0		
Del,Mex-GS>UAS-sno-3 (RU)	134	35,0	37,0	39,0	41,0	43,0	Del,Mex-GS-sno-3 (RU) v.s. Del,Mex-GS/sno-3 (No RU)	0,000
Del,Mex-GS>UAS-sno-3 (No RU)	70	52,0	60,0	64,0	66,0	68,0		
Del,Mex-GS>UAS-cDNA-CG6296 (RU)	220	40,0	56,0	64,0	68,0	76,0	Del,Mex-GS>UAS-cDNA-CG6296 (RU)	0,000
Del,Mex-GS>UAS-cDNA-CG6296 (No RU)	215	32,0	36,0	40,0	42,0	58,0		
Del,Mex-GS>UAS-ninaD-RNAi (RU)	195	52,0	64,0	68,0	70,0	76,0	Del,Mex-GS>UAS-ninaD-RNAi (RU) v.s. (No RU)	0,000
Del,Mex-GS>UAS-ninaD-RNAi (No RU)	223	33,0	37,0	41,0	47,0	59,0		
<b>Over-expression</b>								
Myo1A>UAS-jou	170	42,0	56,0	64,0	66,0	72,0	Myo1A/UAS-jou v.s. Control-1 (Myo1A/+)	0,000
Control-1 (Myo1A/+)	203	21,0	39,0	49,0	53,0	63,0	Myo1A/UAS-jou v.s. Control-2 (UAS-jou/+)	0,000
Control-2 (UAS-jou/+)	214	35,0	49,0	57,0	63,0	69,0		
Mex>UAS-jou	167	46,0	54,0	58,0	62,0	68,0	Mex/UAS-jou v.s. Control-1 (Mex/+)	0,000
Control-1 (Mex/+)	203	32,0	44,0	50,0	58,0	62,0	Mex/UAS-jou v.s. Control-2 (UAS-jou/+)	0,000
Control-2 (UAS-jou/+)	266	23,0	43,0	49,0	55,0	61,0		
Mex-GS>UAS-jou (RU)	195	53,0	59,0	63,0	65,0	73,0	Mex-GS/UAS-jou (RU) v.s. Mex-GS/UAS-jou (No RU)	0,000
Mex-GS>UAS-jou (No RU)	199	51,0	55,0	59,0	61,0	65,0		
Mex-GS>UAS-sno2 (RU)	210	41,0	49,0	59,0	63,0	71,0	Mex-GS/UAS-sno2 (RU) v.s. Mex-GS/UAS-sno2 (No RU)	0,476
Mex-GS>UAS-sno2 (No RU)	196	43,0	49,0	59,0	61,0	73,0		
Mex-GS>UAS-sno3 (RU)	222	48,0	54,0	62,0	66,0	72,0	Mex-GS/UAS-sno3 (RU) v.s. Mex-GS/UAS-sno3 (No RU)	0,169
Mex-GS>UAS-sno3 (No RU)	204	49,0	53,0	59,0	65,0	75,0		

**Supplementary Table 2 (Statistics of Stress tests)**

Condition	Name	n	Age in days at % mortality					Statistics	
			25%	50%	75%	90%	100%	Condition	P-value
Dessication (young)	Control (CS)	100	5,0	6,0	7,0	7,0	8,0	Control (CS) v.s. Del (Deletion-F4)	0,000
	Del (Deletion-F4)	100	3,0	5,0	6,0	7,0	7,0	Control (CS) v.s. Del+rescue-1	0,056
	Del+rescue-1	120	5,0	5,0	6,0	7,0	7,0	Control (CS) v.s. rescue-1	0,000
	rrescue-1	100	5,0	6,0	8,0	9,0	9,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-1	0,007
Dessication (old)	Control (CS)	96	6,0	8,0	9,0	10,0	11,0	Control (CS) v.s. Del (Deletion-F4)	0,024
	Del (Deletion-F4)	108	5,0	8,0	9,0	10,0	11,0	Control (CS) v.s. Del+rescue-1	0,000
	Del+rescue-1	75	9,0	10,0	11,0	12,0	12,0	Control (CS) v.s. rescue-1	0,001
	rescue-1	93	8,0	9,0	10,0	11,0	11,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-1	0,000
Starvation (young)	Control (CS)	100	48,0	48,0	60,0	60,0	72,0	Control (CS) v.s. Del (Deletion-F4)	0,000
	Del (Deletion-F4)	100	48,0	60,0	60,0	72,0	84,0	Control (CS) v.s. Del+rescue-1	0,000
	Del+rescue-1	100	48,0	48,0	60,0	72,0	84,0	Control (CS) v.s. rescue-1	0,090
	rescue-1	100	48,0	48,0	60,0	72,0	84,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-1	0,410
Starvation (old)	Control (CS)	100	36,0	36,0	48,0	60,0	60,0	Control (CS) v.s. Del (Deletion-F4)	0,707
	Del (Deletion-F4)	100	24,0	36,0	48,0	48,0	72,0	Control (CS) v.s. Del+rescue-1	0,000
	Del+rescue-1	100	36,0	48,0	48,0	60,0	72,0	Control (CS) v.s. rescue-1	0,040
	rescue-1	100	36,0	36,0	48,0	60,0	72,0	Del (Deletion-F4) v.s. Del+rescue-1	0,002
Dessication (young)	Del,Myo1A>UAS-jou (rescued)	100	5,0	6,0	7,0	8,0	10,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
	Control-1 (Del,Myo1A/Del)	100	5,0	5,0	6,0	7,0	8,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,001
	Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	169	4,0	5,0	6,0	8,0	9,0		
Dessication (old)	Del,Myo1A>UAS-jou (rescued)	70	7,0	9,0	10,0	11,0	12,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
	Control-1 (Del,Myo1A/Del)	90	6,0	7,0	8,0	9,0	11,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,000
	Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	65	5,0	7,0	9,0	10,0	11,0		
Starvation (young)	Del,Myo1A>UAS-jou (rescued)	180	48,0	60,0	72,0	84,0	84,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
	Control-1 (Del,Myo1A/Del)	200	36,0	48,0	60,0	72,0	84,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,120
	Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	52	48,0	48,0	60,0	72,0	84,0		
Starvation (old)	Del,Myo1A>UAS-jou (rescued)	80	48,0	60,0	72,0	84,0	84,0	Del,Myo1A/jou (rescued) v.s. Control-1 (Del,Myo1A/Del)	0,000
	Control-1 (Del,Myo1A/Del)	120	36,0	48,0	60,0	60,0	72,0	Del,Myo1A-jou (rescued) v.s. Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	0,000
	Control-2 (Del,UAS-jou/Del)	74	36,0	48,0	60,0	72,0	84,0		

## Supplementary Experimental Procedures

### Sequence of Primers used in this study.

- Drosophila 66851F = 5'-GATACGACTGAAGGTCTCACT-3'
- Drosophila 68140R = 5'-CAAGCTGATCATGCAAGAGG-3'
- snoRNAgenomic-F: 5'-GCGCTCTAGAGGACATGGCTTTAGTATTCC-3'
- snoRNAgenomic-R: 5'-CGTCTAGAACATTGCCTCCGTACATCCA-3'
- Drosophila forward: (snoRNA-Fb) (5'-AAAGCGTTAGATATTAACTG-3')
- Drosophila reverse (snoRNA-Rb) (5'-TACTGTGGTTAGTACCTC-3')
- sno-2: 67163F + Bgl2: 5'-CG AGATCT AATGTGCGTTGTCCCATGCA-3'  
67329R + Xho1: 5'-GGCCCG CTCGAG GGTTAATAGAATTCATAATTGTTC-3'
- sno-3: 66963F + Bgl2: 5'-GGGCC AGATCT TGTTGTCCAATGCACGCTCA-3'  
67118R + Xho1: 5'-GGGCC CTCGAG GTATGTATACCTAATTGTTTGAC-3'
- Drosophila rp49 forward primer: 5'-CACAAATGGCGCAAGCCCAAGG-3'
- Drosophila rp49 reverse primer: 5'-TTGAGAACGCAGGCGACCGTTG-3'
- Cyclin E: Forward: GACGACTCGCACATTATCCA  
Reverse: CTTGTGACTAGAGGCGGGAG

### Pseudouridylation (*Drosophila*):

- PseudoU-Reverse-18S : TGCCAACATGAATGAAGGCT
- PseudoU-Reverse-28S : AAGATCGTTTCGACCCTAAG

Primer to generate the genomic ribosomal DNA fragment for sequencing:

- 18S-Forward: TCTCGAATCTATGGGTGGTG
- 18S-reverse : GGACCTCTCGGTCTAGTAAA
- 28S-Forward: CGAAACAGTTCTGACGTGCA
- 28S-Reverse: TGGGCACCGTAACATTACGT

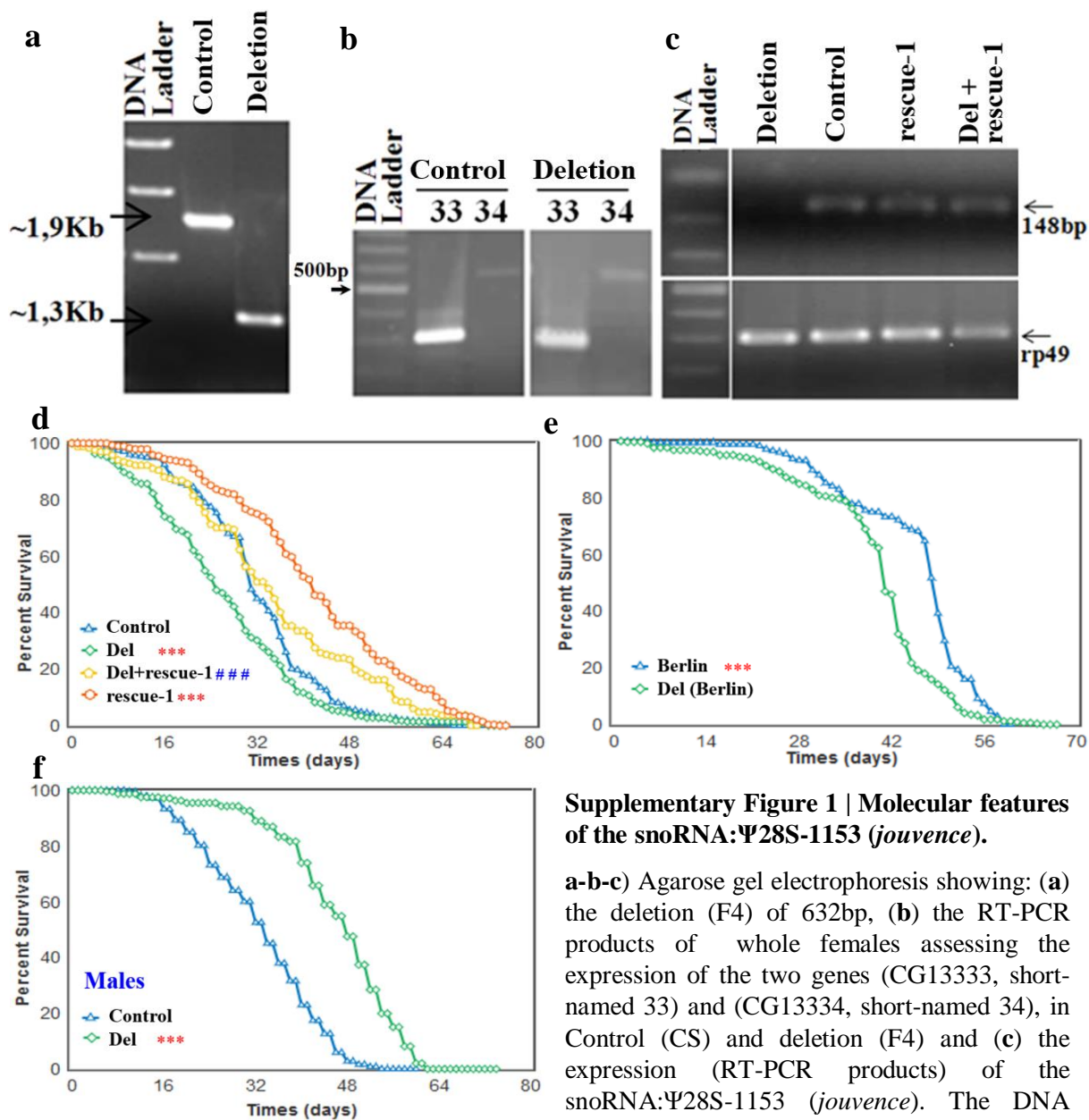
### Mouse:

- Ctnnd2 : Forward: GGGAAATGATCAGCCTCAAA  
Reverse: GACAGGCTGTGTGGAAACCT
- EPC1 : Forward: GGGTTCAAGGTGAAGGATGA  
Reverse: GGGAACCCGAAGTCTGTGTA

### Human:

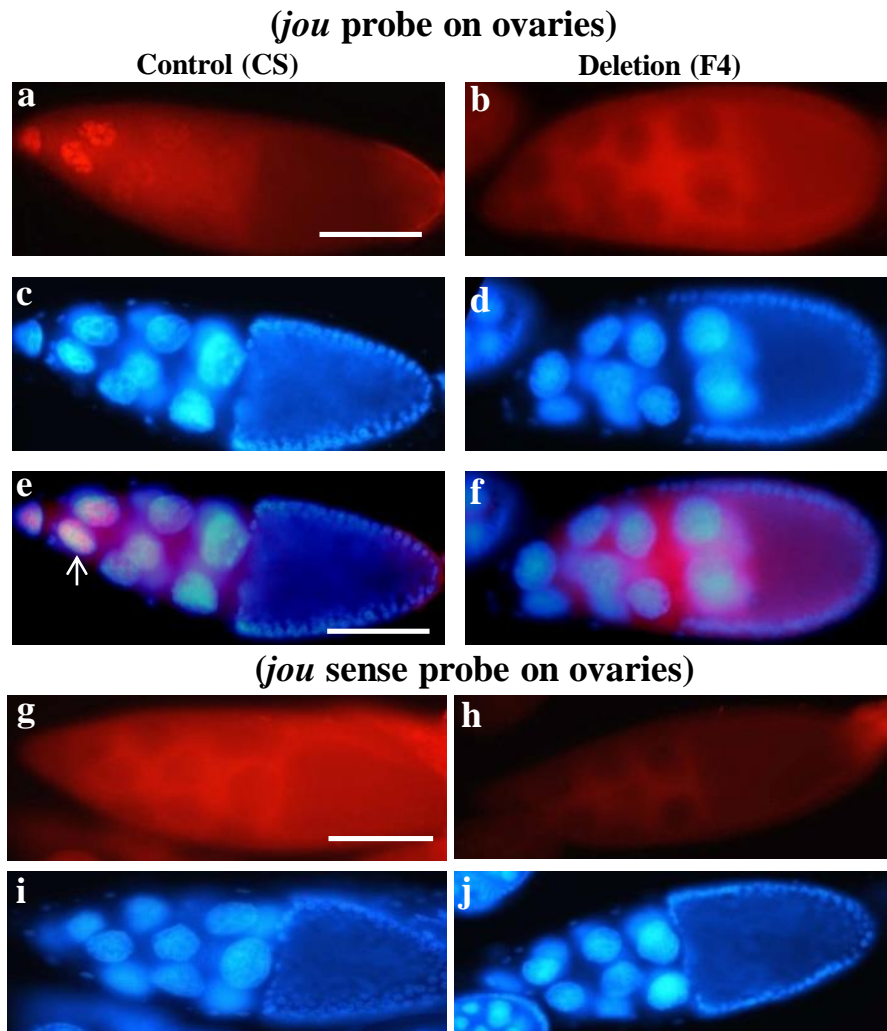
- TEAD1 : Forward: ACCAAACCCAGGAGGAGACT  
Reverse : ACCCCTTCTGCATCATTGTC





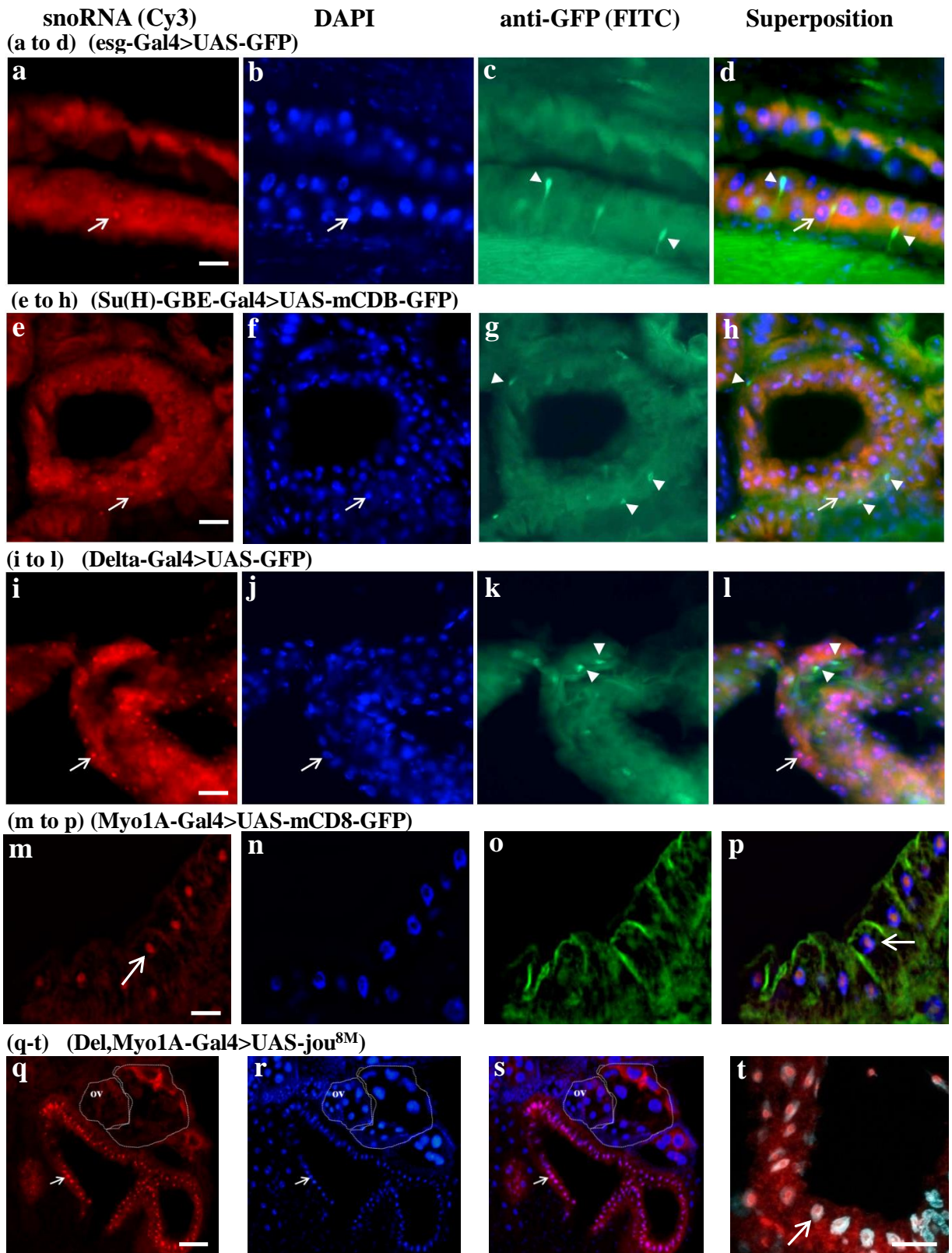
### Supplementary Figure 1 | Molecular features of the snoRNA:Ψ28S-1153 (*jouvence*).

**a-b-c)** Agarose gel electrophoresis showing: (a) the deletion (F4) of 632bp, (b) the RT-PCR products of whole females assessing the expression of the two genes (CG13333, short-named 33) and (CG13334, short-named 34), in Control (CS) and deletion (F4) and (c) the expression (RT-PCR products) of the snoRNA:Ψ28S-1153 (*jouvence*). The DNA band of *jou* (148 bp) is present in control (CS), but absent in deletion. Transgenic flies without and with the deletion (rescue-1 and Del+rescue-1), also show a 148 bp band, confirming the expression of *jou*. Lower panel: rp49 used as control. (d) Decreasing cumulative of the second and independent experiments of females Control (CS), Del (deletion F4), Del+rescue-1 and rescue-1. (e) Decreasing cumulative of the females deletion in the Berlin genetic background compared to their respective controls (Co-Isogenic-Berlin). As within the Cantons-S genetic background, the deletion flies have a reduced lifespan. (f) Decreasing cumulative of males Control (CS), and Del (deletion F4) (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed Statistics, see Table-S1) \*\*\* =  $p < 0,001$ , compared to Control; #### =  $p < 0,001$  compared to Deletion). p-value calculated by log-rank test. For the d,e,f panels, Source data are provided as a Source Data file.



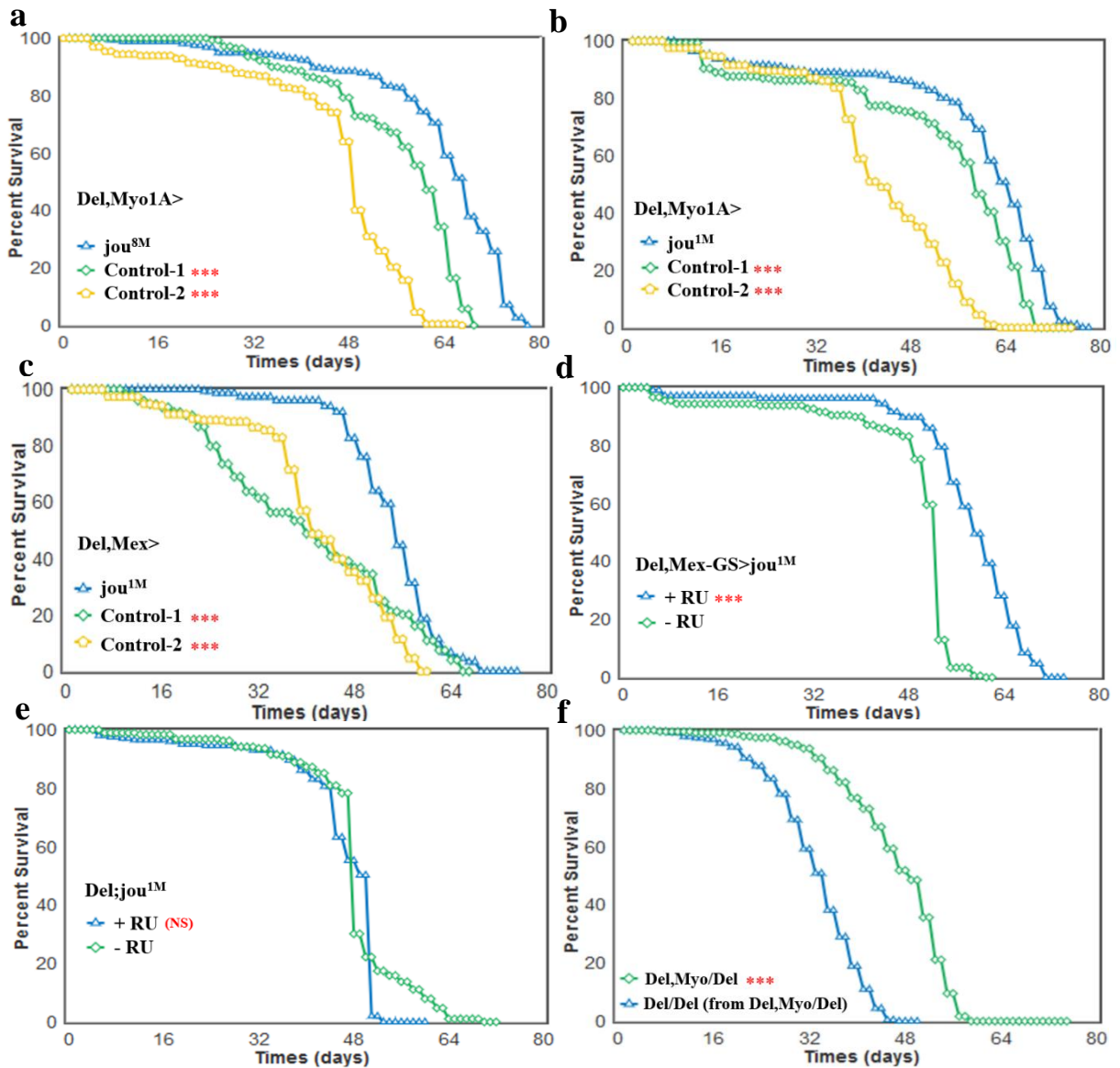
**Supplementary Figure 2 | *In situ* hybridization on ovaries and *jou* sense probe used as negative control.**

**(a to f)** *in situ* Hybridization (ISH) of *jou* in ovaries. **(a)** Expression in Control-CS and **(b)** in deletion flies. As expected, *jou* is not expressed in deletion. **(c-d)** Counterstaining with DAPI to label the nucleus, in Control **(c)** and deletion **(d)**. **(e-f)** overlay images of **(a-c)** and **(b-d)** respectively, revealing *jou* in the nucleolus of nurse-cells (white arrow) (scale bar = 100mm). **(g to j)** ISH on ovaries using the sense probe of *jou* as negative control. Left panel: Control flies. Right panel: deletion. As expected, *jou* is not detected in either Control **(g)** or deletion **(h)**. DAPI counterstaining to label the nucleolus **(i)** and **(j)** (scale bar = 100mm).



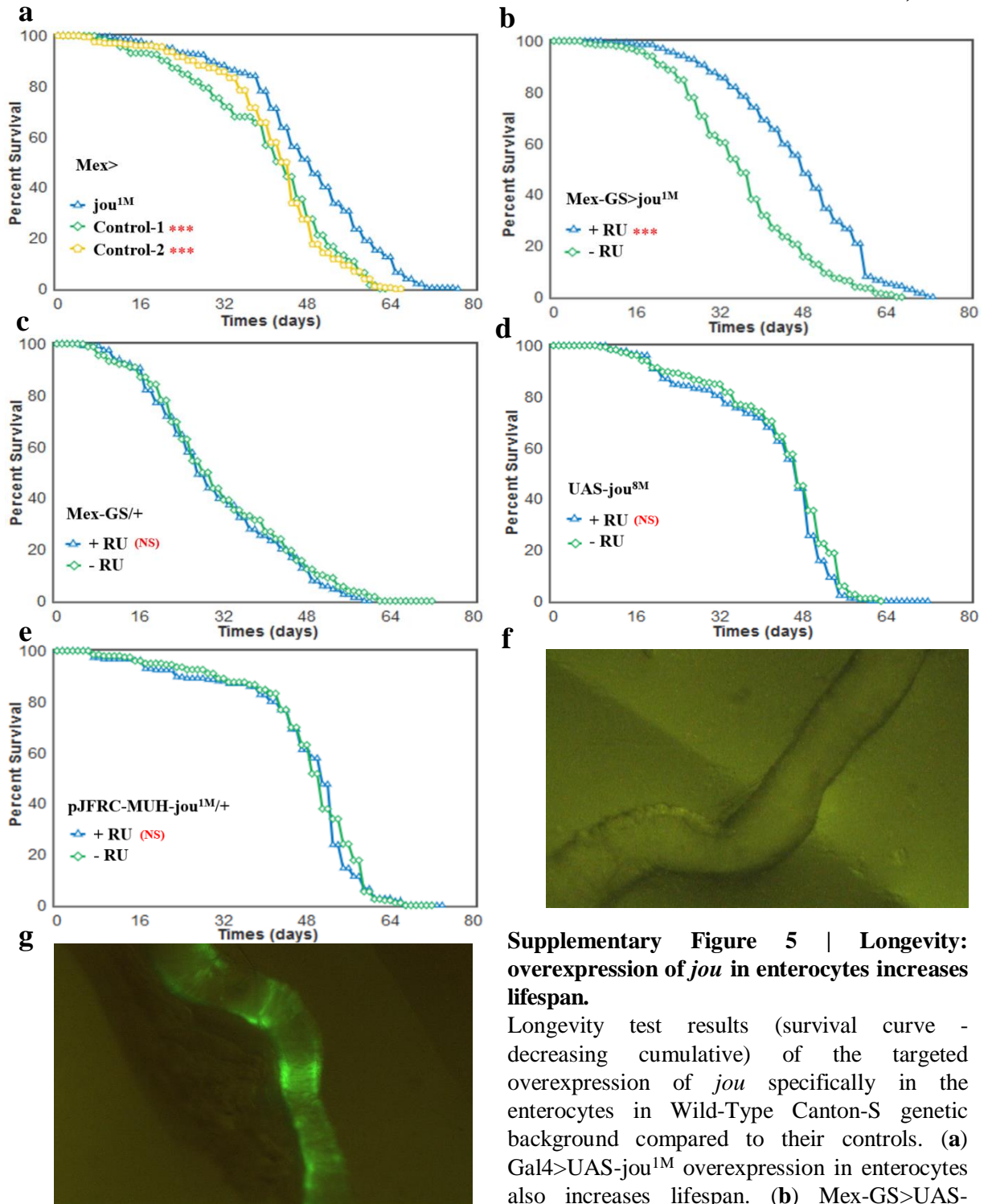
**Supplementary Figure 3 | *In situ* hybridization reveals that *jou* is expressed only in enterocytes.**

ISH on four different gut-Gal4 drivers demonstrate that *jou* is specifically expressed in enterocytes, and is not detected in other epithelial cell types. Left panel: *jou* snoRNA expression revealed with fluorophore tyramide-Cy3 amplification (red dots: white arrow). Second panel from the left: DAPI staining (blue). Third panel from the left: antibody staining directed against the targeted GFP (anti-GFP) (FITC in green: white arrowhead). Fourth panel from the left: Superimposed images to reveal co-localisation. Triple labelling in **(a to d)** *esg*-Gal4>UAS-GFP line labelling ISCs, **(e to h)** Su(H)-GBE-Gal4>UAS-mCDB-GFP labelling EBs, and **(i to l)** Delta-Gal4>UAS-GFP labelling ISCs showed that these cells in green (white arrowhead) do not express *jou* (white arrow). **(m to p)** Triple labelling of *jou* snoRNA, nucleus and GFP reporter gene in transgenic flies with targeted expression of GFP in the gut enterocytes using the Myo1A-Gal4 driver (Myo1A-Gal4>UAS-mCD8-GFP). **(m)** the *jou* expression in red (white arrow) revealed by ISH (tyramide-Cy3), **(n)** DAPI staining in blue, **(o)** anti-GFP staining in green (FITC), and **(p)** overlay of the three images revealed that *jou* is expressed exclusively in the nucleolus of enterocytes. **(q)** Double labelling of *jou* located in the nucleus in deletion specifically expressing *jou* in enterocytes (Myo1A-Gal4>UAS-*jou*<sup>8M</sup> in deletion). **(q)** *jou* expression in the epithelium of the gut (red dots: white arrow), but as expected, no expression in the ovaries (ov), **(r)** DAPI staining in blue, and **(s)** overlay of both images revealed that *jou* is expressed exclusively in the nucleolus of the enterocytes. **(t)** Magnified view taken with a confocal (63X) revealed that *jou* is located in the nucleolus. All panels: scale bar = 25mm, except **(q)** = 50mm.



### Supplementary Figure 4 | Replicates of longevity rescue experiments

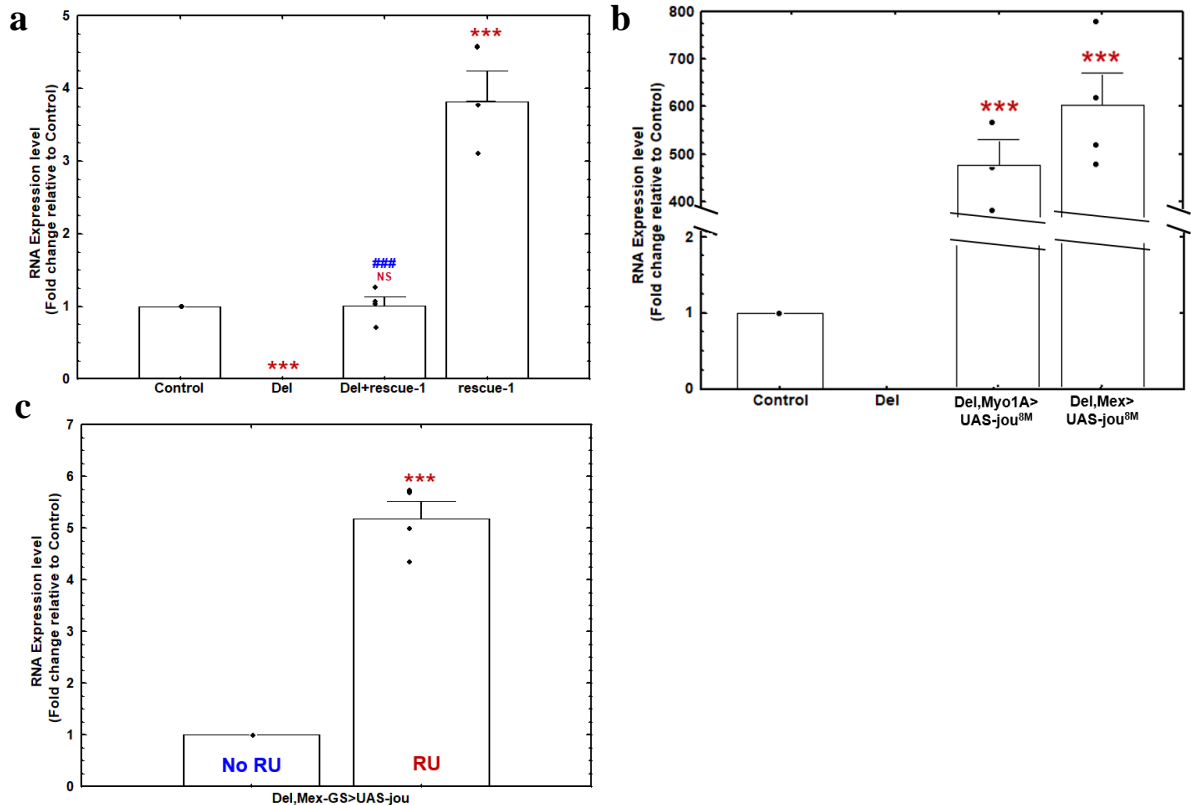
Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative) of the targeted expression of the snoRNA: $\Psi$ 28S-1153 specifically in the enterocytes in deletion compared to their controls. **(a)** Replicate of the  $Del,Myo1A-Gal4>UAS-jou^{8M}$  expression in enterocytes is sufficient to increase lifespan. **(b)**  $Myo1A-Gal4$  driving the second transgenic flies line ( $pJFRC-MUH-jou^{1M}$  in the deletion background ( $Del,Myo1A-Gal4>pJFRC-MUH-jou^{1M}$ ) in enterocytes also increases lifespan. **(c)**  $Mex-Gal4$  driving the second transgenic flies line ( $pJFRC-MUH-jou^{1M}$  in the deletion background ( $Del,Mex-Gal4>pJFRC-MUH-jou^{1M}$ ) in enterocytes also increases lifespan. **(d)** Similarly, the conditional  $Mex-GS$  driving the second transgenic flies line ( $pJFRC-MUH-jou^{1M}$  in the deletion background ( $Del,Mex-GS>pJFRC-MUH-jou^{1M}$ ) fed with the RU486 only in adulthood, which triggers the expression of the snoRNA- $jou$ , also increases lifespan compared to the non-fed (non-induced) sibling flies. **(e)** RU486 control: feeding the RU486 to  $Del;pJFRC-MUH-jou^{1M}$  (without the  $Mex-GS$  driver) does not modify lifespan. **(f)** Longevity of Deletion flies ( $Del$ ) recovered from the  $Del,Myo1A$  line compared to their parental line ( $Del,Myo-1A$ ) reveals that the Deletion flies have similar lifespan to the original Deletion (shown in Fig. 1b and 1c), while the  $Del,Myo-1A$  shows a longer lifespan. This result demonstrates that the  $Myo1A$  enhancer-trap line has a longevity phenotype *per se* in the deletion genetic background. (for number of flies, age in days at % mortality, and detailed Statistics, see Table-S1) (\*\*\*) =  $p < 0,001$ . p-value calculated by log-rank test. For all panels, Source data are provided as a Source Data file.



### Supplementary Figure 5 | Longevity: overexpression of *jou* in enterocytes increases lifespan.

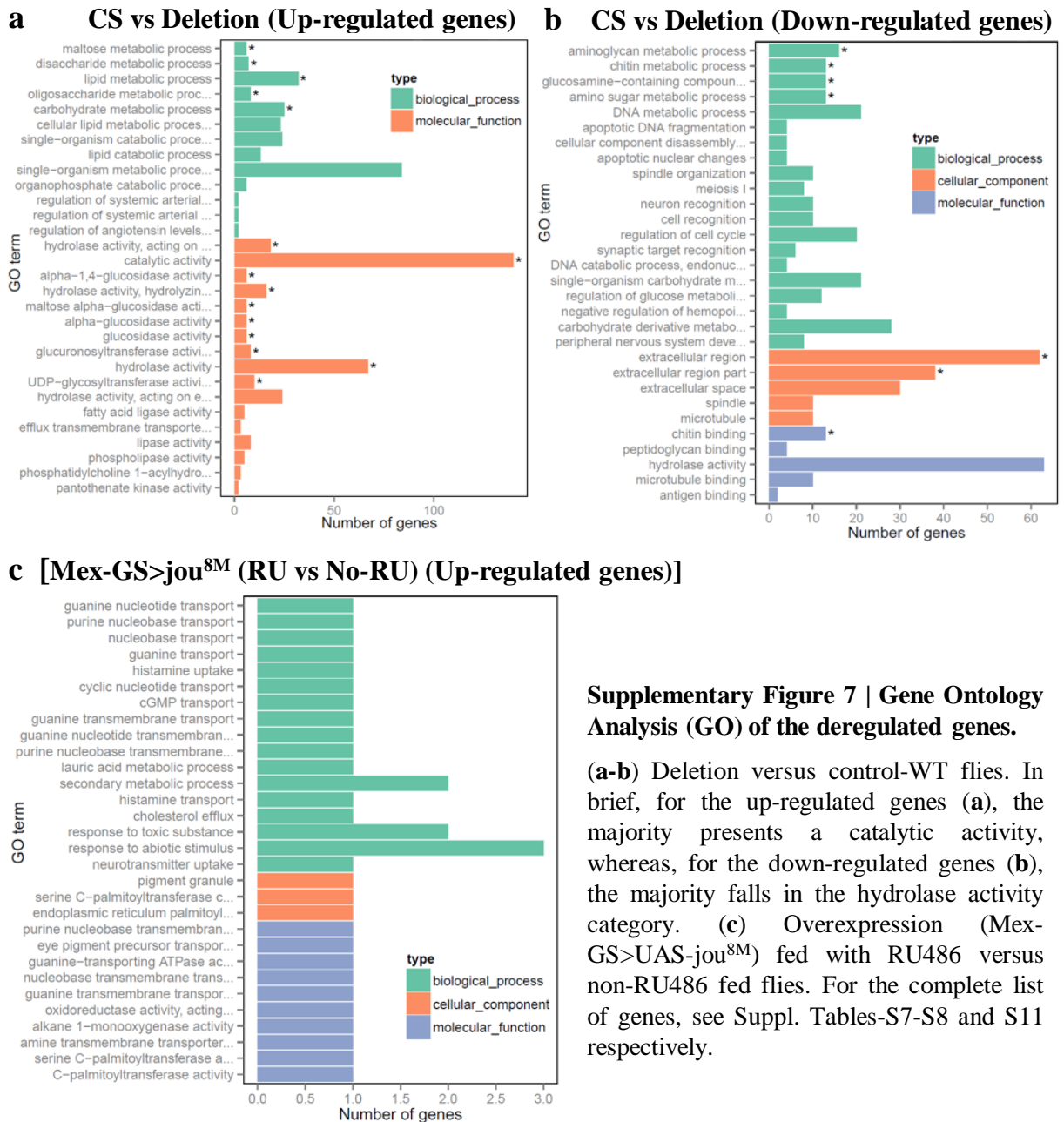
Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative) of the targeted overexpression of *jou* specifically in the enterocytes in Wild-Type Canton-S genetic background compared to their controls. (a) Gal4>UAS-*jou*<sup>1M</sup> overexpression in enterocytes also increases lifespan. (b) Mex-GS>UAS-*jou*<sup>1M</sup>, with and without feeding RU486 increases lifespan. (c-d-e) Three different RU486 controls: feeding the RU486 to the driver line alone (Mex-GS) (without the UAS-*jou* construct) (c), or to the UAS-*jou*<sup>8M</sup> alone (without a Gal4-driver) (d), or to the pJFRC-MUH-*jou*<sup>1M</sup> alone (e) have no effect on lifespan. (f-g) Feeding the RU486 to the Mex-GS>UAS-GFP flies induces the expression of the GFP in the gut (g), while the GFP is not expressed in non RU486 fed flies (f). This results demonstrate that the Mex-GS transgenic flies are functional and expressed in the gut.

p-value calculated by log-rank test. For the a,b,c,d,e panels, Source data are provided as a Source Data file. 10

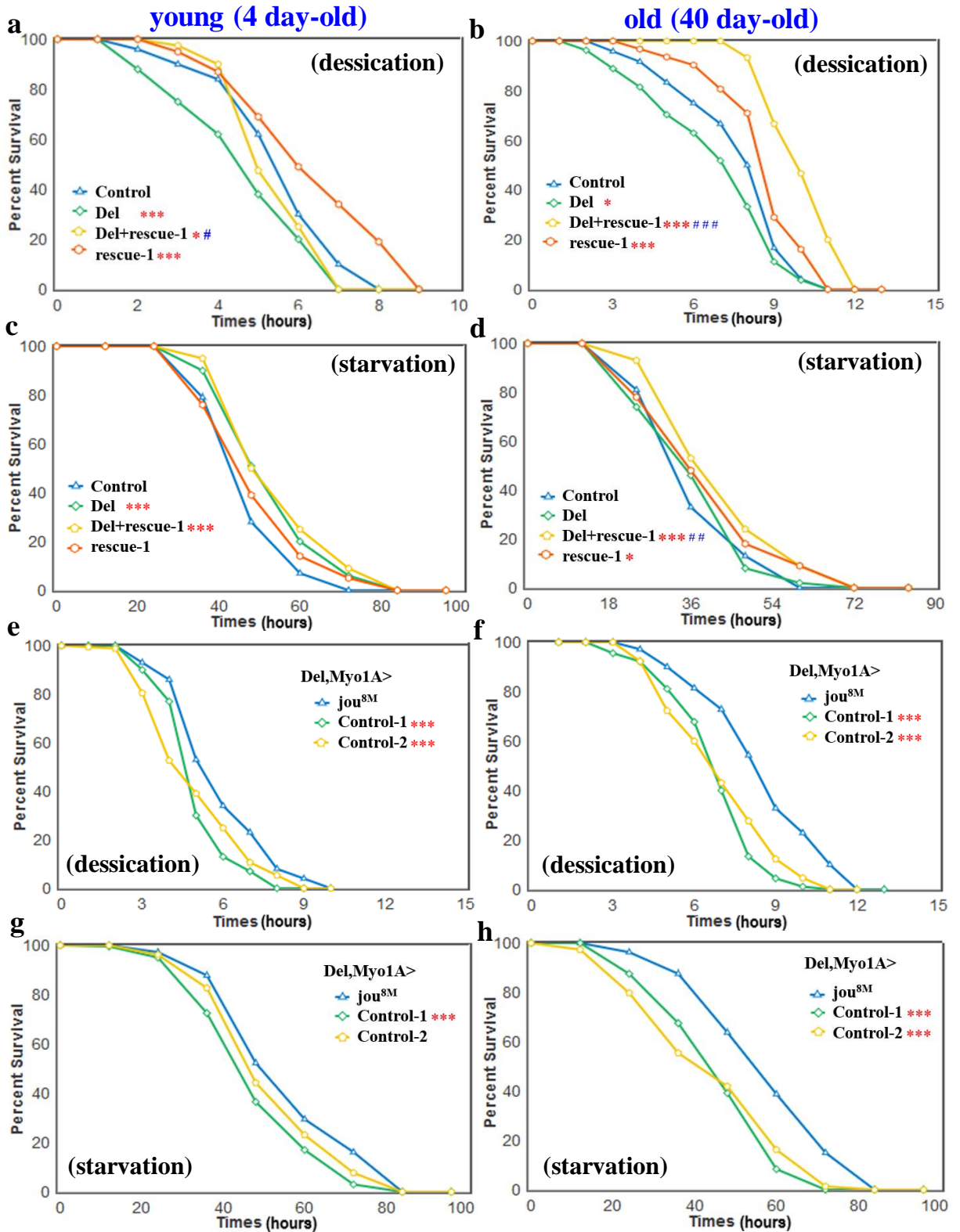


### Supplementary Figure 6 | Relative RNA levels of *jou* expression from total-RNA of the gut.

Histogram of RT-qPCR (Taqman) showing the relative levels of *jou* expression from the total-RNA of the gut. **(a)** Control (CS: n=4), Del (deletion F4: n=4), genomic-rescued in the deletion (Del+rescue-1: n=4), and genomic-rescued transgene in the Wild-Type (rescue-1: n=3) (overexpression) (normalised and compared to Control-CS=1) (n=6 for each genotypes). **(b)** Quantification of the targeted expression of *jou* specifically in the enterocytes, both in Myo1A-Gal4 and Mex-Gal4 driving the UAS-*jou*<sup>8M</sup> in the deletion background, compared to the deletion. The expression is highly increased in flies expressing *jou* (Del,Myo1A-Gal4: n=3, and Del,Mex-Gal4: n=4) (for Control and Del: same data than **a**). **(c)** The conditional Mex-GS flies (Del,Mex-GS>*jou*<sup>8M</sup>) fed with RU486 only in adulthood confirms the induction of the expression of *jou* compared to their sibling flies without RU486 (for each condition, n=4). (\*\*\*) p<0,0005 compared to CS, ### p<0,0005 compared to F4). The snoRNA-*jouvence* is normalized to the level of rp49. For each condition, 30 guts were dissected for the total RNA extraction. In all panels, error bars represent the mean +/- S.E.M. (p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). For all panels, Source data are provided as a Source Data file.







**Supplementary Figure 8 | Desiccation and Starvation tests**

(**a-b**) Desiccation and (**c-d**) Starvation tests in young (**a-c & e-g**) and old flies (**b-d & f-h**) of genomic-rescued flies (Del+rescue-1) (**a-b-c-d**) and of enterocytes targeted *jou* through Myo1A-Gal4 line (Del,Myo1A>UAS-*jou*<sup>8M</sup>) (**e-f-g-h**). Both in young and old flies, the targeted expression of the snoRNA-*jou* in the enterocytes increases the resistance to desiccation and starvation, compared to their co-isogenic control flies (Del,Myo1A/Del and UAS-*jou*<sup>8M/+</sup>) (for Statistics: see Table-S2) p-value calculated by log-rank test. For the all panels, Source data are provided as a Source Data file.

## Supplementary Figure 9

Soulé et al.,

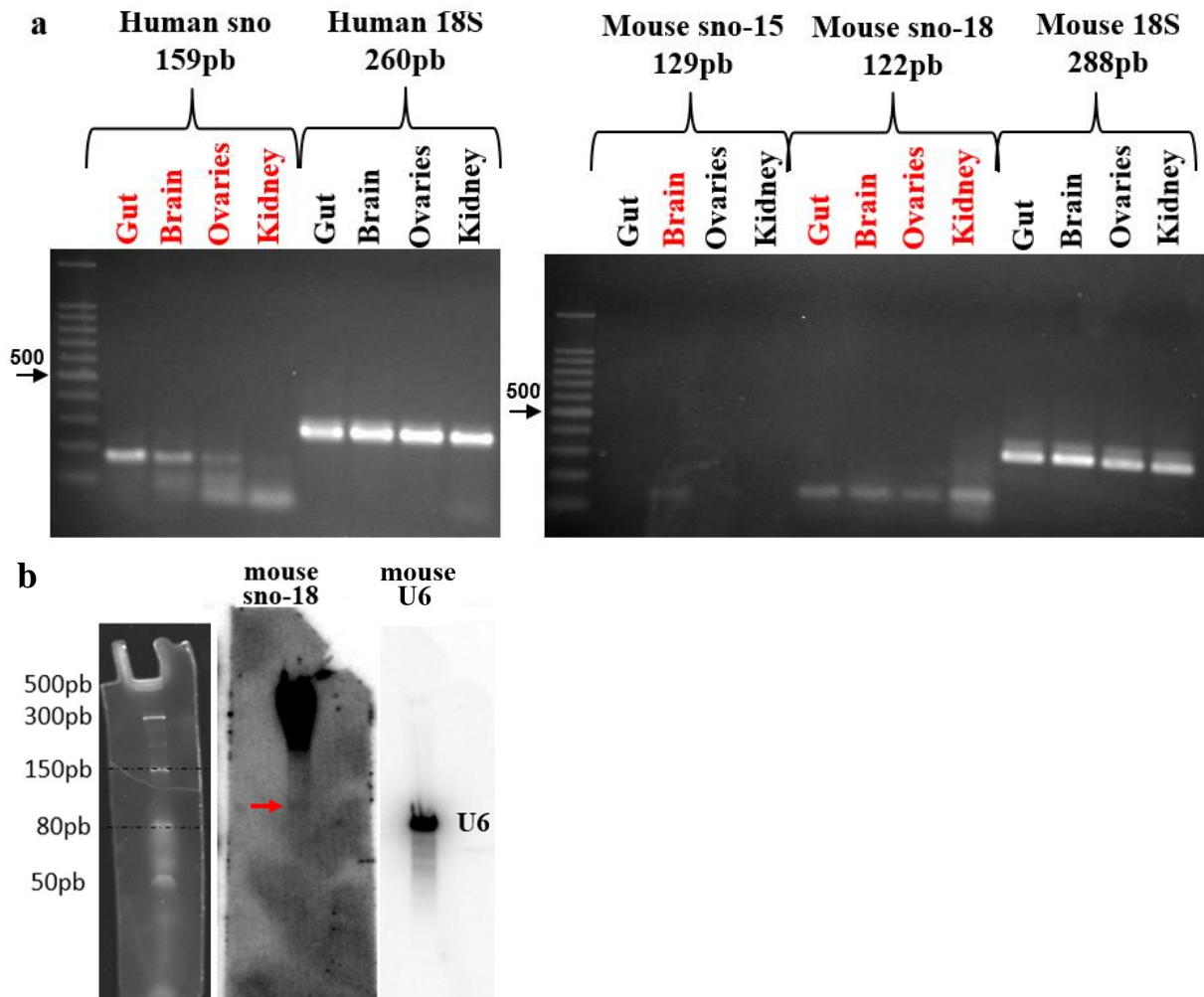
```
sno3 GTTGTCCAATGCACGCTCAACTGCCCATTTTCCAGGGTAGCAGAGTGCTATTTT-GAAGG 59
sno2 GTTGTCCCATGCACGCCCATTTGCCCATTTTCCAGGGTAATTGGGTGCTATTTTGAAGG 60
*****.***** **: *****. :*.***** *****

sno3 ACATATAGAAAACCCATCGACAATCTTACC-AAATGTCTGGCCTATTTTCGTGGGCCTTGC 118
sno2 ACATATAGAAATCATGTGAACAATCTTACCGAAACGTTTGGCTAATTTTTTGG-CACTGC 119
*****:*. * .***** *** * * * * :***** *** *. ***

sno3 ATTTCCTTTAAATTGTCAAACAATT 143
sno2 TTTTCATTTAAATTGTTGAACAATT 144
:****.***** .*****
```

**Supplementary Figure 9 | The snoRNA-2 and snoRNA-3 present a high degree of identity.**

In yellow: the H-box (ANANNA) is complete in the snoRNA-3 but not in the snoRNA-2, in blue: the main difference, in green: the ACA-box.



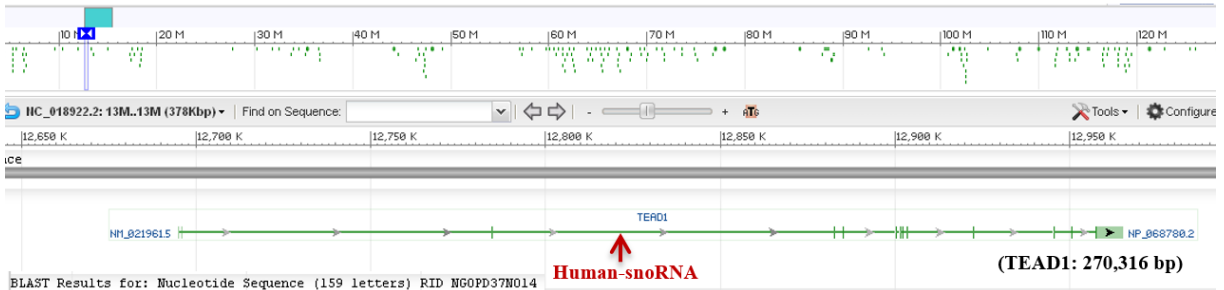
**Supplementary Figure 10 | Mammalian orthologues of the snoRNA-*jouvence*.**

(a) The RT-PCR products assessing the expression of the snoRNA in the gut, brain, ovaries and kidney of the human snoRNA (159 bp) and of the two mouse snoRNAs (snoRNA-15=129 bp) and (snoRNA-18=122 bp). In human, *jou* is detected in the gut, brain, weakly in ovaries and kidney. In mouse, the snoRNA-15 is detected in brain, but not in the gut, ovaries, and kidney. The mouse snoRNA-18 is detected in the gut, brain, ovaries, and kidney. On the right side of each gel, the human 18S and mouse 18S used as positive control, for each respective tissues. The tissues that express a snoRNA are labeled in red. (b) Northern Blot on total RNA extracted from the mouse gut reveals that the snoRNA-18, the one expressed in the gut, is faintly detected and processed at 122 nucleotides [notice the high level background noise due to the long exposition (7 days) to detect the signal. On the right side, the same Northern Blot re-probed with U6 (107 nucleotides) used as loading control (exposition = 2 hours)].

**a Human snoRNA: (in TEA domain family member 1 gene (SV40 transcriptional enhancer factor) (Location: 12,694,856..12,965,21 3Length: 270,358)**

**Homo sapiens chromosome 11, alternate assembly CHM1\_1.1, whole genome shotgun sequence**

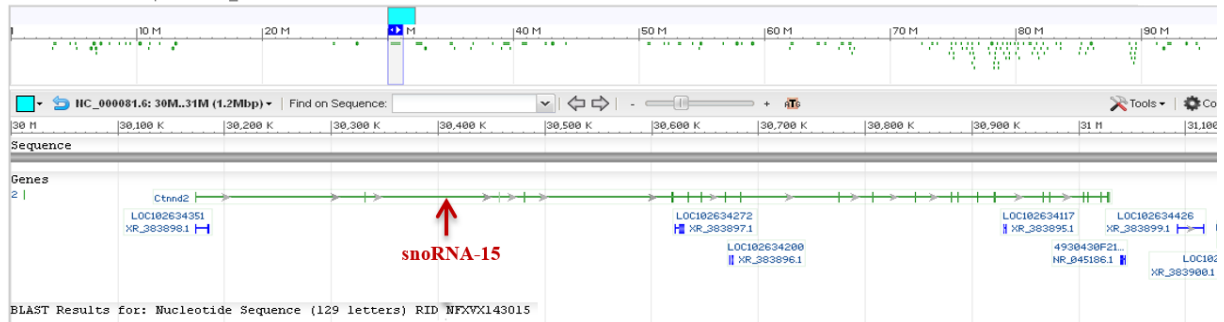
NCBI Reference Sequence: NC\_018922.2



**b mouse snoRNA-15: in Ctndd2 gene = catenin delta-2 (cadherin associated protein)**

**Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 15, GRCm38.p2 C57BL/6J**

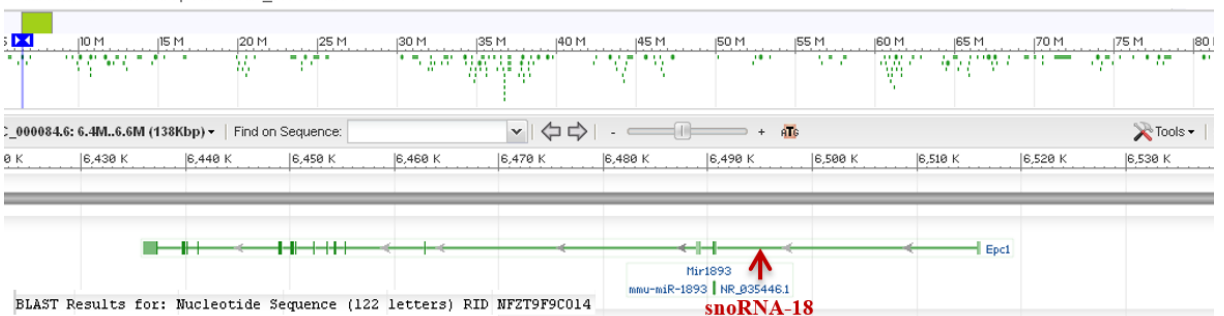
NCBI Reference Sequence: NC\_000081.6



**c mouse snoRNA-18 (in Epc1 gene = Enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila))**

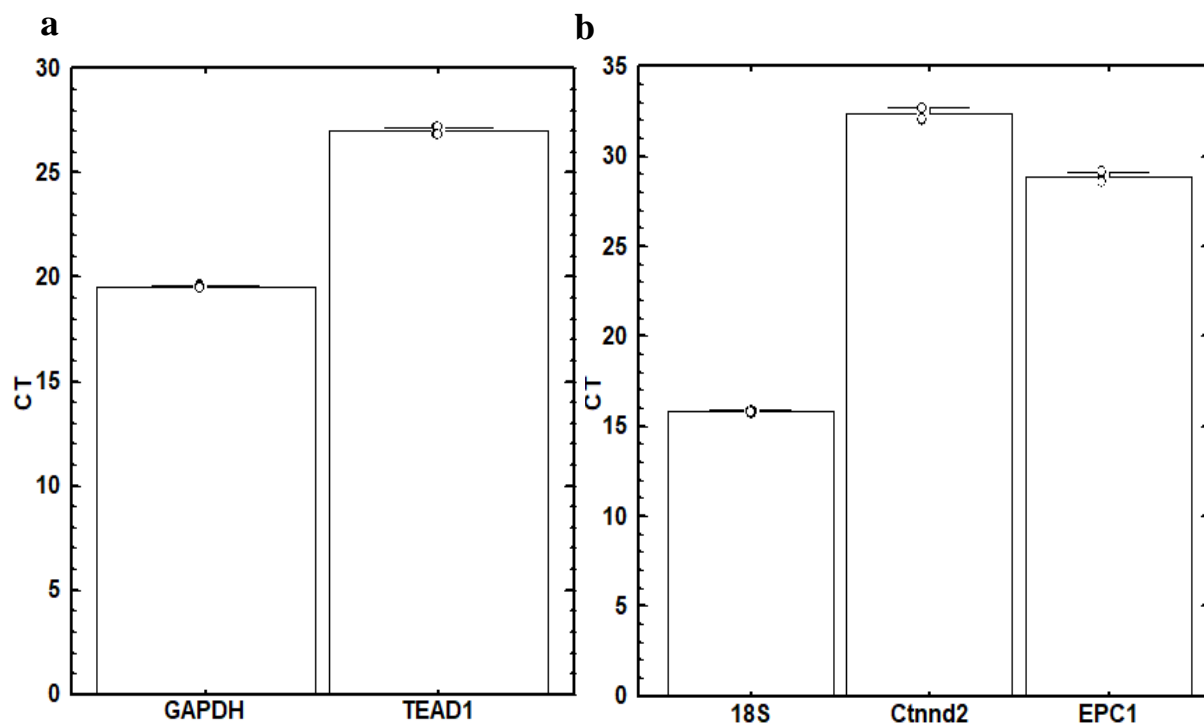
**Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 18, GRCm38.p2 C57BL/6J**

NCBI Reference Sequence: NC\_000084.6



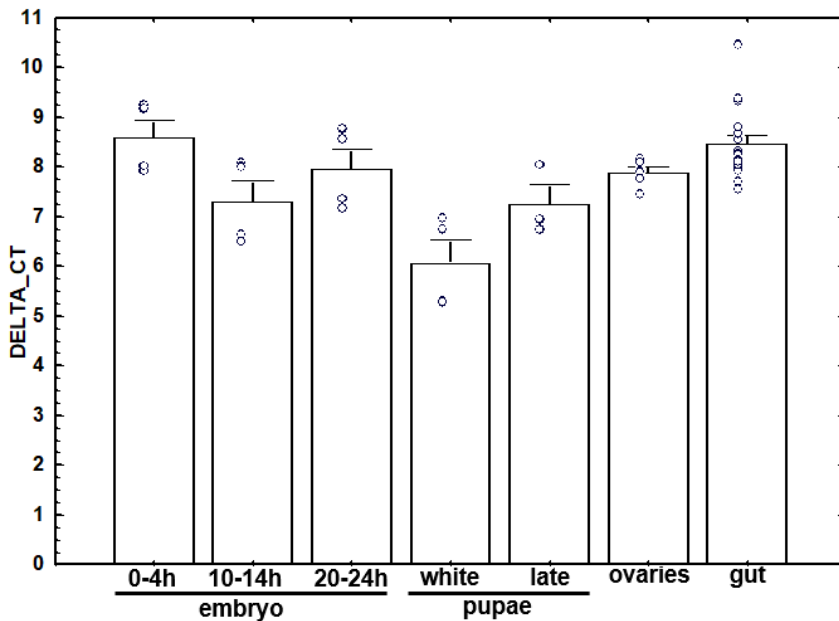
**Supplementary Figure 11 | *jouvence* mammalian orthologues are located in a long intron of specific genes.**

(a) In human, the snoRNA *jouvence* is located in a long intron of the TEAD1 (TEA domain family member 1) gene. In mouse (b) the snoRNA-15 is located in the long intron of the Ctndd2 (catenin delta-2: a cadherin associated protein) gene, while (c) the snoRNA-18 is located in the gene EPH1 (enhancer of polycomb homolog 1 isoform 1).



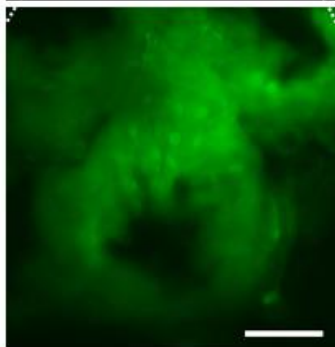
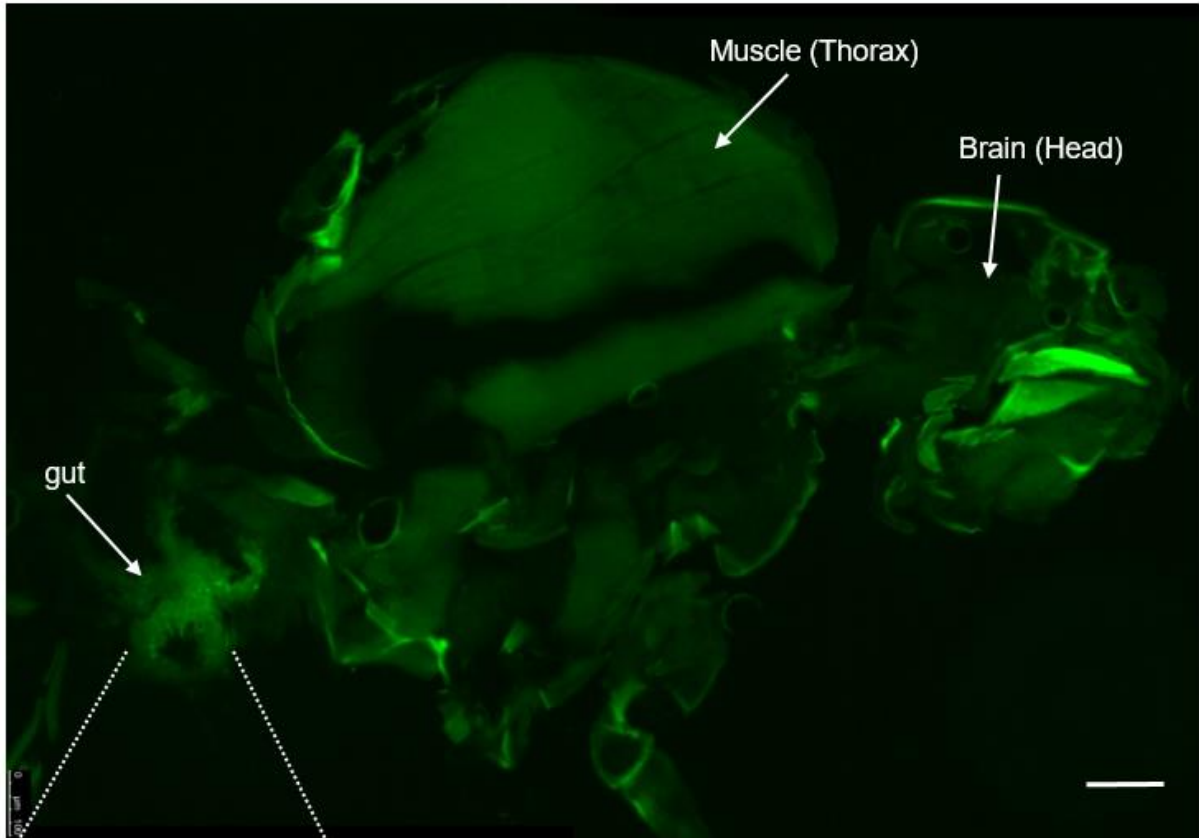
**Supplementary Figure 12. The genes encompassing the *snoRNA-jouvence* are expressed in the gut.**

(a) CT histogram of the Human TEAD1 gene revealing that this last is expressed in the gut ( $\Delta\text{CT}=7,1$ ) compared to the reference gene GAPDH. (b) CT histogram of the mouse Ctnnd2 gene ( $\Delta\text{CT}=7,0$ ), and EPC1 ( $\Delta\text{CT}=13,2$ ) revealing that these last are faintly expressed in the gut, compared to the reference gene 18S-rRNA.  $n=2$  for each panel (gene). Error bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). For all panels, Source data are provided as a Source Data file.



**Supplementary Figure 13. Developmental expression of *jouvence* (RT-qPCR).**

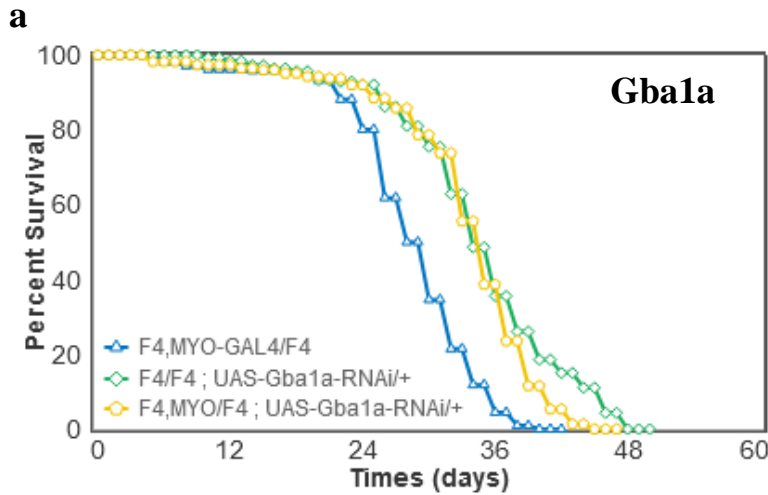
In *Drosophila*, RT-qPCR (Taqman) reveals that the snoRNA *jouvence* is expressed, but weakly, at different developmental stages. The results are presented as the  $\Delta$ -CT compared to the reference gene rp49. These results are in accordance to the low expression level revealed by the modENCODE reported in Flybase (<http://flybase.org/>). Error bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. (p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test). 0-4h, 10-14h, 20-24h, and white pupae: n=4, late pupae: n=3, ovary: n=5, gut: n=17. Source data are provided as a Source Data file.



**Supplementary Figure 14. Expression pattern of the Mex-GS>UAS-GFP-nls after induction by RU486.**

Expression pattern of the Mex-GS>UAS-GFP-nls of a 15 day-old female fly following feeding by RU486 (since 15 days). We can remark that the GFP is expressed, as expected, only in the epithelium of the gut, but not in the muscle (thorax) or in the brain (head) or any other cells. Since we use, for visualisation, directly the fluorescence of the GFP, we can also observe some non-specific autofluorescence due to the cuticle surrounding the head and partly the thorax.





**b**

Name	No. of subjects	Age in days at % mortality				
		25%	50%	75%	90%	100%
F4,MYO-GAL4/F4	312	26	28	32	36	40
F4/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+	253	32	34	40	46	48
F4,MYO/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+	225	31	35	37	41	45

**c**

Condition	P-value
F4,MYO-GAL4/F4 v.s. F4/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+	0
F4,MYO-GAL4/F4 v.s. F4,MYO/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+	0
F4/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+ v.s. F4,MYO/F4 ; UAS-Gba1a-RNAi/+	0.0017

**Supplementary Figure 15 | Restoring the mRNA level of Gba1a does not rescue the lifespan.**

a) Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative) of the targeted expression of a RNAi against the Gba1a gene (Del,Myo-Gal4>UAS-Gba1a-RNAi) specifically in the enterocytes in deletion (F4) compared to their two respective controls does not rescue the lifespan of the flies, and even it is slightly deleterious when compared to one control line. B) Numbers of female flies for each genotype, and age in days at % mortality. C) Statistics: calculated by log-rank test. Source data are provided as a Source Data file.

## Description of Additional Supplementary Files (RNA-Seq Analysis)

**Supplementary Data 1:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed upregulated genes (sorted-p value)

**Supplementary Data 2:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed down-regulated genes (sorted-p value)

**Supplementary Data 3:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed upregulated genes: KEGG pathway

**Supplementary Data 4:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed down-regulated genes: KEGG pathway

**Supplementary Data 5:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed upregulated genes: GO enrichment

**Supplementary Data 6:** Deletion versus Control (Wild-Type)  
Differentially expressed down-regulated genes: GO enrichment

**Supplementary Data 7:** MexGS>UAS-jou<sup>8M</sup> (RU) versus MexGS-Control (No RU)  
Differentially expressed upregulated genes (sorted-p value)

**Supplementary Data 8:** MexGS>UAS-jou<sup>8M</sup> (RU) versus MexGS-Control (No RU)  
Differentially expressed upregulated genes: KEGG pathway

**Supplementary Data 9:** MexGS>UAS-jou<sup>8M</sup> (RU) versus MexGS-Control (No RU)  
Differentially expressed upregulated genes: GO enrichment

## 2.2. Résultats complémentaires non publiés.

A ce stade de l'étude, il est admis que la mutation de *jouvence* perturbe l'homéostasie proliférative de l'intestin, mais que sa surexpression permet, quant à elle, de prévenir ces défauts. En plus des résultats de l'article publié, obtenus en majorité sur des mouches jeunes de 7 jours, j'ai mené les mêmes expérimentations pour étudier la réponse de l'épithélium intestinal à l'absence et à la présence de *jouvence* sur des mouches vieilles âgées de 40 jours.

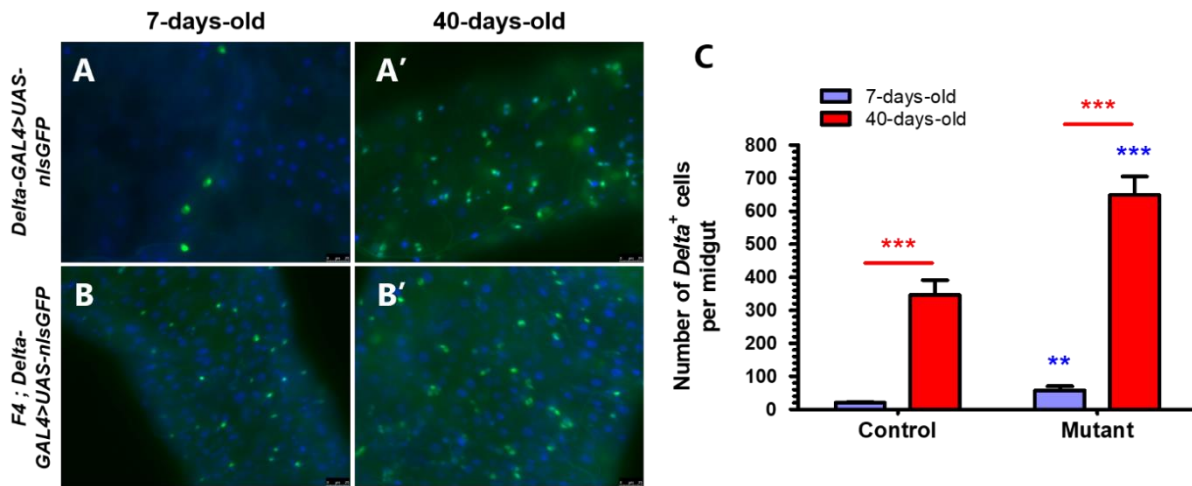
### 2.2.1. Etude de l'homéostasie de l'épithélium intestinal suite à la perte de *jouvence*.

#### a. Augmentation associée à l'âge du nombre de cellules proliférantes dans l'intestin des mutants nuls pour *jouvence*.

Pour déterminer les changements cellulaires dans l'intestin suite à la délétion de *jouvence* au cours du vieillissement, nous avons d'abord évalué le nombre de CSI en utilisant des marqueurs cellulaires intestinaux spécifiques. Nous avons commencé par l'utilisation de mouches *Delta-GAL4>UAS-nlsGFP*, dans laquelle la *GFP* est exprimée sous le contrôle du promoteur *Dela-GAL4* (263). Delta est un ligand du récepteur Notch et un marqueur très spécifique des CSI adultes. Dans un premier temps, les résultats ont montré que le nombre de CSI positives pour la GFP (*Delta*<sup>+</sup>) a augmenté de 16,5 fois avec l'âge chez les mouches de type sauvage (Fig. 34A, A' et C). Une augmentation est également observée chez les mutants *jouvence*. En effet, le nombre de CSI a augmenté de 10,7 fois chez les phénotypes mutants de 40 jours par rapport à ceux âgés de 7 jours (Fig. 34B, B' et C). De plus, les résultats ont révélé une augmentation significative de deux fois dans le nombre de cellules *Delta*<sup>+</sup> chez les mouches mutantes par rapport aux contrôles à tout âge (Fig. 34C).

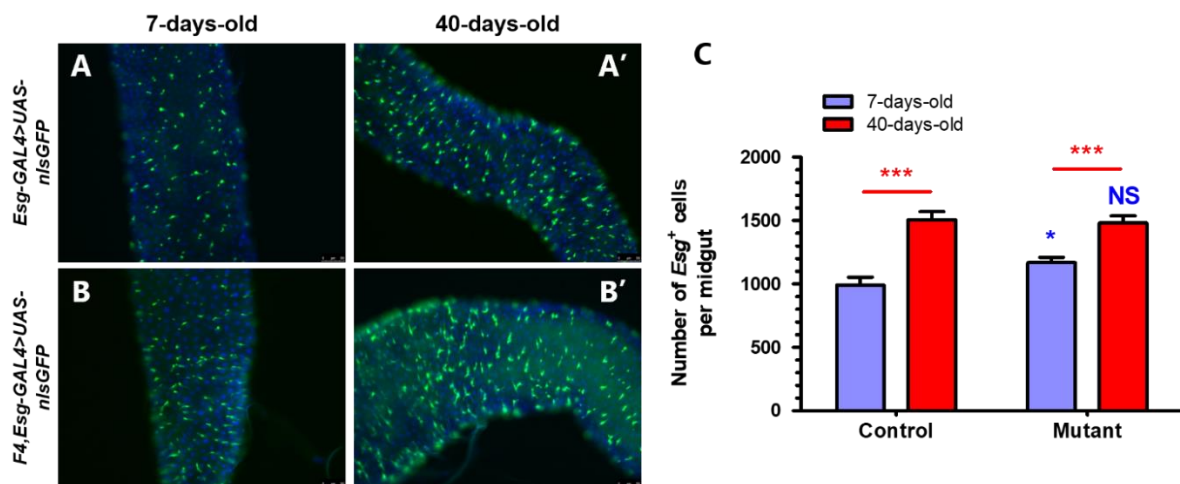
Lors de tests supplémentaires, nous avons également tenté d'évaluer le nombre de CSI et d'EB, des cellules post-mitotiques engagés dans la différenciation, en fonction de l'âge en exprimant l'*UAS-nlsGFP* dans ces cellules avec l'utilisation d'un autre outil génétique, *Esg-GAL4 (Esg-GAL4 ; UAS-nlsGFP)* (263). En effet, l'expression de la GFP induite par la lignée pilote *Esg-GAL4* a été détectée à la fois dans les CSI et les EB dispersés tout le long de l'intestin moyen des femelles adultes. Les CSI et EB sont apparus sous la forme de petites cellules diploïdes, et étaient facilement distinguables des grands EC polyploïdes de l'intestin moyen. Comme observé précédemment, nous avons observé une augmentation de 1,6 fois du nombre de cellules positives pour la GFP (*Esg*<sup>+</sup>) dans l'intestin moyen adulte des contrôles (Fig. 35A, A' et C) et de 2,4 fois pour les mutants par rapport à leur homologue à 7 jours (Fig. 35B, B' et C). Cependant, l'intestin des mutants nuls pour *jouvence* a montré un nombre similaire de cellules *Esg*<sup>+</sup> totales par rapport aux témoins à 7 et 40 jours (Fig. 35C). Ensemble, ces résultats prouvent à nouveau que le vieillissement et la perte de la fonction de *jouvence*

ont induit une augmentation dans le nombre de CSI.



**Figure 34 – La mutation de *jouvence* a affecté les CSI dans l'intestin moyen.**

La construction *Delta-GAL4/UAS-nlsGFP* permet de visualiser les CSI. **(A - B)** Intestins de mouches de type sauvages et mutantes âgées de 7 **(A et B)** et 40 jours **(A' et B')** marqués par l'expression de la GFP dans les CSI. **Vert** : Cellules *Delta*<sup>+</sup> (GFP nucléaire) ; **Bleu** : Visualisation de l'ADN (DAPI). Barre d'échelle : 25 µm. **(C)** Nombre total de cellules positives pour *Delta* (*Delta*<sup>+</sup>) détectées par intestin sur des mouches de 7 **(bleu)** et 40 jours **(rouge)**. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*CS*) sont affichées en **bleu**, tandis que celles qui mettent en évidence les différences significatives pour le même génotype à divers âges sont affichées en **rouge**.



**Figure 35 – Augmentation du nombre de cellules *Esg*<sup>+</sup> chez les mouches vieillissantes.**

Le transgène *Esg-GAL4; UAS-nlsGFP* permet d'identifier les CSI et les EB. **(A - B)** Images représentatives d'intestin de mouches témoins et mutantes à 7 **(A et B)** et 40 jours **(A' et B')** exprimant la GFP dans les CSI et EB. **Vert** : Cellules *Esg*<sup>+</sup> (GFP nucléaire) ; **Bleu** : Visualisation de l'ADN (DAPI). Barre d'échelle : 50 µm. **(C)** Quantification du nombre total de cellules positives pour *Esg* (*Esg*<sup>+</sup>) dans l'intestin de mouches jeunes de 7 **(bleu)** et vieilles de 40 jours **(rouge)**. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*CS*) sont affichées en **bleu**, tandis que celles qui mettent en évidence les différences significatives pour le même génotype à divers âges sont affichées en **rouge**.

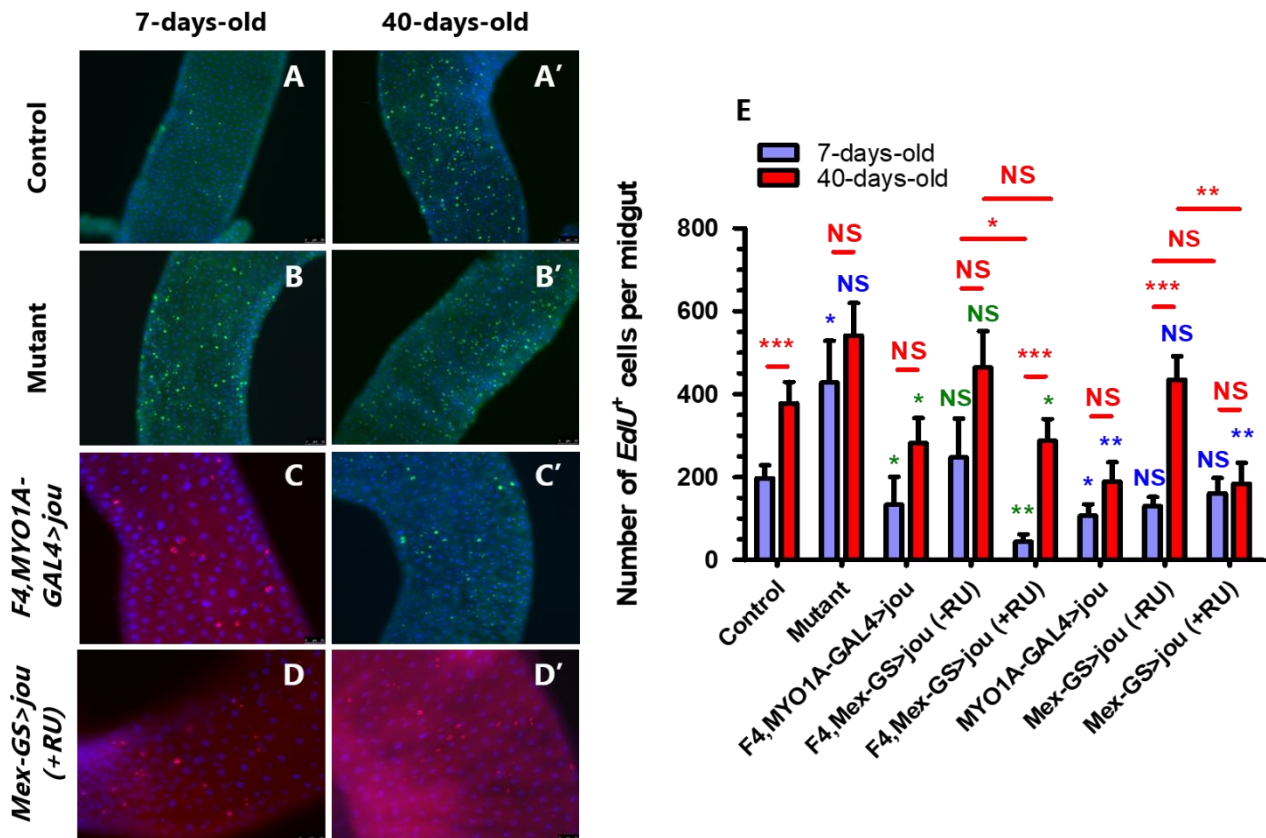
## **b. *jouvence* induit des changements dans l'activité proliférative des CSI.**

Cette augmentation dans le nombre de cellules *Delta*<sup>+</sup> dans l'intestin au cours du vieillissement suggère une prolifération élevée des CSI et/ou une défaillance dans la différenciation des cellules progénitrices. Pour tester ces possibilités, nous avons analysé la dynamique du renouvellement de l'épithélium intestinal en utilisant le marquage à l'EdU, qui permet de détecter à la fois les cellules en division et aussi celles en endoréplication. Alors que les CSI sont quiescentes dans les intestins jeunes (Fig. 36A et E), nous avons trouvé une incorporation importante de l'EdU dans les intestins vieux des mouches de type sauvage, ce qui suggère que les CSI prolifèrent à des taux élevés dans les intestins plus âgés (Fig. 36A' et E). En revanche, le marquage EdU des intestins mutants à 7 et 40 jours a montré un nombre similaire de cellules proliférantes (Fig. 36B, B' et E). Toutefois, la perte de *jouvence* a entraîné une augmentation du nombre de cellules marquées à l'EdU (*EdU*<sup>+</sup>) à 7 jours par rapport aux contrôles, mais aucune différence observée à 40 jours (Fig. 36E). Nous avons ensuite déterminé si *jouvence* module l'activité proliférative des CSI et des cellules progénitrices de l'intestin adulte au cours du vieillissement. Nous avons alors conduit la réexpression de *jouvence* spécifiquement dans l'intestin dans le fond génétique mutant en utilisant deux lignées pilote distinctes, la *MYO1A-GAL4* et la *Mex-GAL4-GS* avec une expression conditionnelle uniquement à l'âge adulte suite à une induction au RU486. Effectivement, les deux lignées transgéniques ont montré une réduction significative des cellules *EdU*<sup>+</sup> par rapport aux mutants à 7 et 40 jours (Fig. 36C, C' et E). De plus, la surexpression de *jouvence* dans l'intestin (*Mex-GAL4-GS>UAS-jou* et *MYO1A-GAL4>UAS-jou*) permet de prévenir ces troubles hyper-prolifératifs associés à l'âge (Fig. 36D, D' et E).

Pour vérifier davantage la nécessité de *jouvence* dans la prolifération des CSI, nous avons ensuite mesuré l'indice mitotique des CSI dans l'intestin adulte mutant. Les CSI sont les seules cellules mitotiques dans l'intestin adulte, et le marquage pH3 permet ainsi de révéler les CSI qui sont en mitose (263) (264). Étonnamment, l'immunocoloration avec un anticorps contre le marqueur mitotique pH3 dans l'intestin entier n'a révélé aucune différence statistique dans le nombre de cellules positives pour pH3 (*pH3*<sup>+</sup>) entre les mouches témoins de 7 et 40 jours (Fig. 37A, A' et E). Par contre, la suppression de *jouvence* a provoqué une augmentation significative de la prolifération des CSI avec l'âge conformément aux résultats obtenus précédemment. Le nombre de cellules *pH3*<sup>+</sup> a augmenté dans les intestins des mutants âgés de 7 et 40 jours par rapport aux mouches contrôles au même âge (Fig. 37B, B' et E). Ainsi, la perte de *jouvence* a causé des défauts dans la division des CSI. Pour confirmer que *jouvence* a une fonction dans le maintien de l'homéostasie intestinale dans des conditions normales, nous avons également évalué l'effet de *jouvence* sur le nombre de cellules proliférantes dans l'intestin adulte à l'aide du marquage à l'anticorps anti-pH3 chez les mouches transgéniques avec une réexpression ciblée de *jouvence* dans l'intestin (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou* et *F4,Mex-GAL4-GS>UAS-jou*). A 7 jours, nous avons observé une diminution significative du nombre de cellules *pH3*<sup>+</sup>. De plus, l'intestin de ces phénotypes a montré un nombre similaire de cellules mitotiques à 40 jours par rapport aux jeunes (Fig. 37C, C' et E). Enfin, la surexpression de *jouvence* dans l'intestin (*MYO1A-GAL4>UAS-jou* et *Mex-GAL4-GS>UAS-*

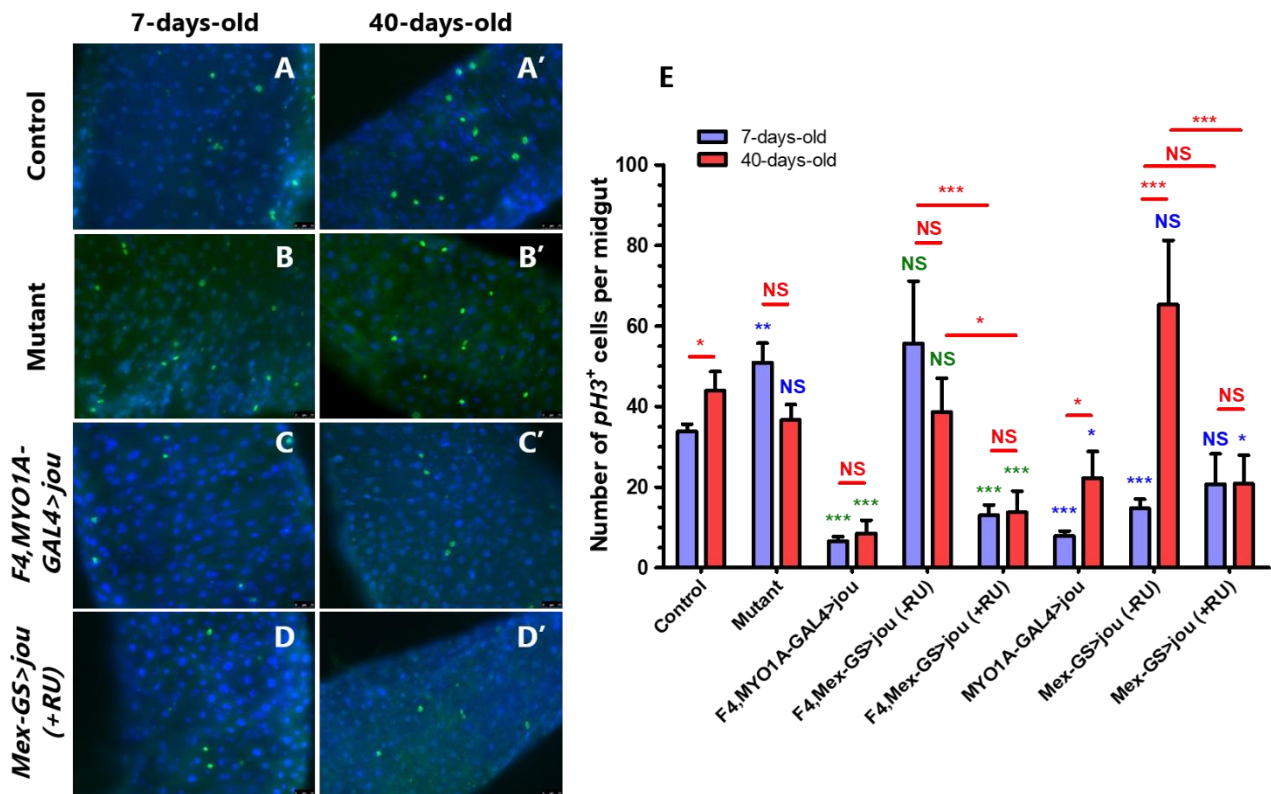
*jou*) a permis de réguler les taux élevés de division des CSI associés à l'âge dans l'intestin (Fig. 37D, D' et E). Ensemble, ces résultats indiquent que *jouvence* est requis pour la régulation de la prolifération des CSI dans des conditions basales.

Collectivement, ces résultats démontrent que la perte de *jouvence* affecte le nombre et l'activité des CSI et des cellules progénitrices dans l'intestin de la drosophile d'une manière similaire à celle associée au vieillissement normal mais avec des taux plus élevés. Plus important, la surexpression de *jouvence* dans l'intestin a permis d'améliorer l'homéostasie proliférative chez les mouches vieilles. Il est cependant primordial de rappeler ici que *jouvence* n'est pas exprimé dans les CSI.



**Figure 36 – *jouvence* régule la prolifération des CSI.**

L'incorporation à l'EdU identifie des cellules en cours de différenciation. (A - D) Visualisation d'EC nouvellement formés (qui se sont divisés et/ou endorépliqués pendant une période définie) d'intestins de différents génotypes testés à 7 (A, B, C et D) et 40 jours (A', B', C' et D'). Vert ou Rouge : Cellules *EdU*<sup>+</sup> ; Bleu : Visualisation de l'ADN (DAPI). Barre d'échelle : 10 µm. (E) Nombre total de cellules *EdU*<sup>+</sup> dans l'intestin de mouches de 7 (bleu) et 40 jours (rouge). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (CS) sont affichées en bleu, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (F4) sont affichées en vert. Les étoiles en rouge montrent les différences significatives observées pour le même génotype à des âges différents.



**Figure 37 – La perte de *jouvence* endommage l'activité proliférative des CSI.**

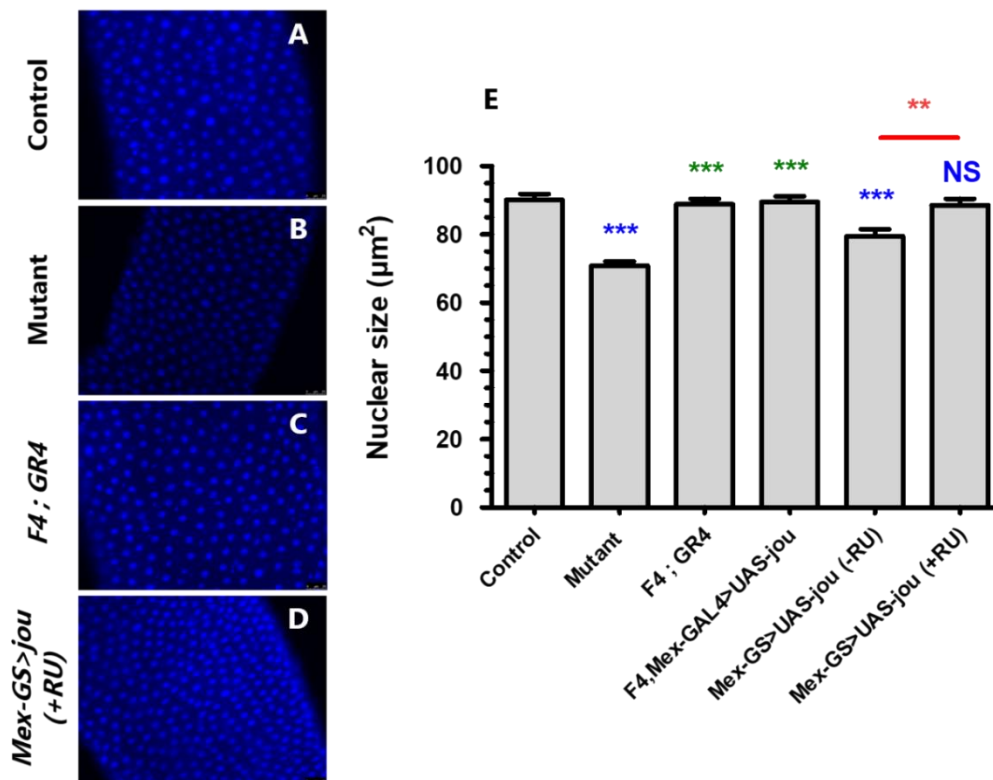
L'anticorps anti-pH3 permet de détecter les CSI en division. (A - D) Intestins des différents génotypes de 7 (A, B, C et D) et 40 jours (A', B', C' et D') marqués avec l'anti-pH3. **Vert** : Cellules  $pH3^+$ ; **Bleu** : Visualisation de l'ADN (DAPI). Barre d'échelle : 25  $\mu$ m. (E) Le graphique montre le nombre total de cellules positives au pH3 ( $pH3^+$ ) par intestin sur des mouches de 7 (bleu) et 40 jours (rouge). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ . Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (CS) sont affichées en bleu, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (F4) sont affichées en vert. Les étoiles en rouge montrent les différences significatives observées pour le même génotype à des âges différents.

## 2.2.2. *jouvence* stimule l'endoréplication et la croissance cellulaire des EC.

Nous avons montré que *jouvence* est exclusivement exprimé dans les EC. Or, les EC sont de grandes cellules polyploïdes absorbantes qui constituent plus de 90% de la masse de l'intestin moyen. Ils occupent alors un rôle crucial dans l'épithélium intestinal. Nous avons ainsi étudié l'effet de *jouvence* sur l'endoréplication des EC. Nous avons détecté une ploïdie plus faible dans les EC des mutants nuls pour *jouvence* que dans ceux des mouches témoins, comme le montre l'imagerie quantitative (Fig. 5E dans (313)). Notamment, la perte de *jouvence* a eu pour conséquence d'inhiber la transcription de plusieurs gènes, dont certains nécessaires à la répllication de l'ADN, et plus particulièrement la *cycline E*.

Comme une polyploïdie est souvent corrélée à une plus grande taille de cellules, cette endoréplication pourrait alors entraîner des EC plus petits dans l'intestin des mouches mutantes. Pour tester cette hypothèse,

nous avons évalué la taille des noyaux des EC dans l'intestin, et plus précisément dans une sous-région de l'intestin moyen antérieur (R2). En effet, les cellules mutantes sous-répliquées ont entraîné des noyaux plus petits (Fig. 38B et E). Cela suggère qu'après la perte de *jouvence*, en plus de l'augmentation des divisions des CSI et un affaiblissement de l'endoréplication, une taille réduite des noyaux des EC est constatée. Cependant, la réexpression de *jouvence* avec la lignée *F4 ; GR4* ou spécifiquement dans l'épithélium intestinal par la lignée pilote *Mex-GAL4* dans le fond génétique de délétion (*F4, Mex-GAL4 > UAS-jou*) a été suffisante pour que les EC subissent une endoréplication plus importante par rapport aux mutants, résultant aussi en des cellules polyploïdes plus grandes (Fig. 38C et E). Ensuite, nous nous sommes demandé si l'expression de *jouvence* était suffisante pour stimuler l'endoréplication. Nous avons surexprimé *jouvence* dans l'épithélium de l'intestin en utilisant le pilote *Mex-GAL4-GS* dans le fond génétique sauvage (*Mex-GAL4-GS > UAS-jou*). Les résultats ont révélé que la teneur en ADN nucléaire de ces cellules avait augmenté de 25% par rapport aux contrôles, ce qui indique qu'elles avaient subi des endocycles supplémentaires. En outre, nous avons observé une augmentation significative de la taille des noyaux des EC en réponse à une surexpression de *jouvence* dans les cellules épithéliales par rapport aux mouches non induites au RU486 (Fig. 38D et E). Ces résultats démontrent qu'une croissance nucléaire élevée et une ploïdie accrue se produisent lorsque *jouvence* est surexprimée dans l'épithélium de l'intestin. Ainsi, *jouvence* est requise pour la croissance et l'endoréplication des EC. De ce fait, la taille des noyaux des EC dépend de l'endoréplication et est essentielle pour une homéostasie intestinale et une régénération efficace.



**Figure 38 – Les cellules endorépliquatives des mouches mutantes ont des noyaux plus petits.**

La taille des noyaux des EC ( $\mu\text{m}^2$ ) dans l'intestin moyen antérieur (R2) a été mesurée. (A - D) Coloration des noyaux de cellules épithéliales d'intestin chez différents génotypes de 7 jours. **Bleu** : Visualisation de l'ADN (DAPI). Barre d'échelle :



25 µm. **(E)** Le graphique illustre la taille moyenne des noyaux des EC dans la R2 sur des mouches de 7 jours. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*CS*) sont affichées en **bleu**, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4*) sont affichées en **vert**. Les étoiles en **rouge** montrent les différences significatives entre la lignée de réexpression (*Mex-GAL4-GS>UAS-jou*) induite au RU486 avec son contrôle génétique non-induit.

### 3. Discussion

Dans l'épithélium intestinal adulte, l'homéostasie tissulaire est maintenue grâce à un équilibre précis entre la prolifération des CSI et la différenciation des cellules progénitrices, et est essentielle pour la préservation de l'intégrité intestinale. Or, nous avons montré dans notre étude que les mécanismes homéostatiques qui maintiennent l'intestin se détériorent chez les mouches nulles pour *jouvence*. En effet, nos résultats fournissent la preuve que l'absence de *jouvence* entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des CSI, ce qui conduit à une accumulation anormale de cellules indifférenciées dans l'intestin, même chez des animaux jeunes élevés dans de bonnes conditions nutritionnelles (313). Les intestins des mutants présentent alors toutes les caractéristiques du phénotype dysplasique observé dans les intestins vieillissants de la drosophile (275). Ainsi, la délétion de *jouvence* semble avoir provoqué un certain stress au niveau de l'épithélium intestinal et a rendu l'épithélium hypersensible. Cependant, le stade de dysplasie précède un grand nombre de cancers. En effet, des études ont montré qu'un défaut dans le maintien du nombre de CSI est souvent à l'origine de la dégénérescence tissulaire liée au vieillissement et du développement de certains cancers. Ces observations peuvent potentiellement expliquer la durée de vie réduite des mutants (313), étant donné que la dysplasie intestinale peut raccourcir la durée de vie adulte (180). De plus, nous avons fourni des preuves démontrant que *jouvence* est un régulateur essentiel de l'activité des CSI dans l'intestin de la drosophile adulte, alors même que ce dernier n'est pas exprimé dans ces cellules. La surexpression de *jouvence* spécifiquement dans l'intestin a effectivement permis de prévenir ces défauts cellulaires largement observés chez des mouches plus âgées (313).

Suite à la perte de fonction de *jouvence*, des perturbations dans la régulation du niveau d'expression de plusieurs gènes sont apparues au sein des EC. En effet, une analyse transcriptomique sur des tissus intestinaux a été réalisée et a révélé qu'un total de 633 gènes a été exprimé de manière différentielle après la perte de *jouvence*, ce qui indique que l'absence de *jouvence* entraîne un changement massif dans le paysage transcriptionnel de l'intestin moyen. Parmi les nombreux gènes dérégulés, l'expression du facteur de transcription *Esg* a été significativement régulée à la baisse. Dans l'intestin moyen de la drosophile adulte, *Esg* est exprimé à la fois dans les CSI *Delta*<sup>+</sup> et dans leurs filles transitoires indifférenciées, les EB. Une étude a montré qu'*Esg* est essentiel pour maintenir l'identité des CSI et bloquer leur différenciation dans un état de

cellule souche. Il le fait en réprimant la transcription des gènes favorisant la différenciation des CSI et des cellules progénitrices, tels que *PDM1* (280). Ils ont notamment démontré que la perte d'*Esg* dans les cellules progénitrices provoque leur différenciation rapide en EC ou en CEE (280). Or dans notre cas, de nombreux EC ont été comptabilisés chez les mutants dépourvus de *jouvence*, ce qui suggère que la régulation négative d'*Esg* a sans doute entraîné une différenciation précoce des EB (313).

Mise à part des gènes impliqués dans la modulation de l'homéostasie proliférative, un certain nombre important de gènes impliqués dans la structure cuticulaire et la matrice péritrophique sont dérégulés chez le mutant (ex : *CG13075*, *CG17145*). La matrice péritrophique est une couche composée de chitine et de glycoprotéines qui tapisse l'intestin moyen de l'insecte. Bien que structurellement différente, elle est fonctionnellement similaire aux sécrétions muqueuses du tube digestif des vertébrés (254). La matrice péritrophique est une barrière physique qui protège l'épithélium de l'intestin moyen contre les particules alimentaires abrasives, les enzymes digestives et les agents pathogènes infectieux. Elle constitue également une barrière biochimique séquestrant et, dans certains cas, inactivant les toxines ingérées (254). Conformément à la littérature, les transcripts codant les enzymes impliquées dans la formation de la matrice péritrophique (péritrophines, protéines de liaison de la chitine, etc...) sont enrichies dans la région cardia/R1, où la matrice péritrophique est synthétisée, et également dans la région R4, suggérant un remodelage de la matrice par les enzymes de l'hôte dans l'intestin moyen postérieur (260). La région du cardia/R1 est également enrichie en transcripts associés à la synthèse de glycoprotéines et à la formation de mucus, ce qui indique que cette région est un site important dans la formation de mucus. Cette découverte laisse penser que le processus de renouvellement de la matrice péritrophique est perturbé dans l'intestin des mouches mutantes. Or, une « mauvaise » synthèse de la barrière péritrophique peut donner libre accès aux bactéries pathogènes. Ces dernières sécrétant des protéases et des chitinases peuvent digérer, et en plus affaiblir la barrière péritrophique permettant ainsi à ces bactéries d'envahir l'épithélium intestinal (327).

Pour combattre l'infection, la mouche s'appuie sur de multiples réactions de défense innées, dont beaucoup sont partagées avec des organismes supérieurs. Ces réactions comprennent l'utilisation de barrières physiques, ainsi que des réponses immunitaires locales et systémiques (libération de peptides antibactériens). En effet, nous avons observé que les gènes codant pour des lysozymes (ex : *LysB*, *LysC*, *LysD* et *LysE*) sont régulés positivement, ce qui montre qu'une réponse inflammatoire a été mise en place. Il est intéressant de noter que la perte de *jouvence* a également entraîné une régulation à la hausse de la voie du système immunitaire innée IMD (immune deficiency). Or, nous avons également observé que les gènes codant pour la protéine de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP), impliquée dans la détection et la dégradation du peptidoglycane des bactéries Gram-négatives en amont de la voie IMD, présentent une expression réduite dans l'intestin des mutants (ex : *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b* et *PGRP-SC2*). En outre, la perte du snoARN *jouvence* a entraîné l'inhibition directe d'un gène peptidique antimicrobien dans l'intestin, *spatzle* (*spz*), un membre de la voie immune Toll avec une activité cytokine. Or, une telle situation rappelle les maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme. En plus des gènes immunitaires, de nombreux gènes impliqués dans la détoxification

(*ex*: *serpines*, *cytochrome P450*, *etc...*) voient leur expression modifiée chez les mutants. Ces composés participent notamment à la neutralisation des composés supposés toxiques présents dans le bolus alimentaire avant son entrée dans l'intestin moyen (260). En accord avec ces observations, nous suggérons que la perte de *jouvence* a pu créer un environnement inflammatoire dans l'intestin. Un tel stress peut endommager l'intestin et est généralement associé à une augmentation du nombre de CSI subissant une mitose pour compenser la perte d'EC (324). C'est justement ce que nous avons observé chez les mutants. En outre, ces données fournissent une explication à la courte durée de vie des mutants.

Nos résultats impliquent *jouvence* comme médiateur de l'homéostasie adaptative, en agissant dans les EC pour réguler l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes. En effet, nous montrons que le snoARN *jouvence* permet de maintenir l'homéostasie intestinale et le nombre de cellules constant en coordonnant la prolifération des CSI avec la perte des cellules différenciées. De plus, nos résultats démontrent que l'expression de *jouvence* dans l'épithélium intestinal favorise la santé et la durée de vie, et soulignent l'importance de son activité dans le vieillissement et les maladies du tractus gastro-intestinal liées à l'âge, car sa perte peut déclencher une dysplasie épithéliale précoce.

# **Chapitre 2 : Détermination du rôle de *jouvence* dans le métabolisme énergétique.**

## **1. Introduction.**

L'épithélium intestinal, considéré comme une interface dynamique, forme une barrière sélective qui permet l'absorption des nutriments, des ions et de l'eau, et limite aussi le contact avec des entités nuisibles, telles que les micro-organismes, les antigènes alimentaires et les toxines environnementales (254) (256). Cependant, des altérations structurales au sein de l'épithélium intestinal, comme celles signalées chez des drosophiles âgées, peuvent engendrer des répercussions sur la fonction intestinale (67) (272) (294). Nous avons vu dans le chapitre précédent que la mutation de *jouvence* affecte l'homéostasie proliférative des CSI. En effet, le processus de régénérescence épithéliale est fortement dérégulé dans l'intestin des mouches, où une prolifération aberrante des CSI se produit entraînant une dysplasie de l'épithélium intestinal dès le plus jeune âge. Ce phénotype dysplasique est caractérisé par une accumulation de cellules mal différenciées et par une perturbation dans l'organisation cellulaire de l'épithélium. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que cette dysplasie entraîne des troubles métaboliques dans l'intestin provoquant notamment des défauts dans l'absorption des nutriments. Afin de déterminer les éventuels impacts de la mutation de *jouvence* sur le système physiologique et fonctionnel de la barrière intestinale, une analyse de l'activité transcriptomique (séquençage d'ARN) du génome de la drosophile a été réalisée sur des intestins isolés entre le génotype sauvage et mutant. Après analyse des résultats bruts, nous avons identifié 633 gènes dérégulés dans l'intestin suite à la perte de fonction de *jouvence*. Dans cette analyse, on dénombre 314 gènes dont l'expression est significativement augmentée et 319 gènes dont l'expression est significativement diminuée (313). Lorsque nous avons analysé les gènes significativement altérés dans nos jeux de données, nous avons remarqué que plusieurs voies physiologiques sont affectées. Nous avons utilisé des outils d'analyse de regroupement et d'enrichissement en termes d'ontologie génétique pour identifier les processus qui sont affectés par la perte de *jouvence* et les catégories fonctionnelles dans nos listes de gènes.

Parmi les 314 gènes surexprimés dans l'intestin des mutants *jouvence* par rapport aux échantillons contrôles, cette analyse a révélé que 84 gènes de la liste sont associés à des processus métaboliques. À partir de la même analyse, nous avons constaté que les termes « processus métabolique », « métabolisme glucidique » et « métabolisme lipidique » sont les termes les plus enrichis. En effet, nous avons constaté que 32 gènes sont impliqués dans le processus métabolique lipidique et 25 dans le métabolisme des glucides (313). Ces résultats révèlent un impact clair de *jouvence* sur les processus métaboliques au niveau transcriptomique dans l'épithélium intestinal, surtout sur le métabolisme lipidique et glucidique. Pour un total de 319 gènes régulés à la baisse, plusieurs processus biologiques ont également été identifiés et nous avons ainsi constaté que les

gènes impliqués dans les processus métaboliques à l'ADN, ainsi que ceux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et le métabolisme des carbohydrates sont significativement surreprésentés (313). Ainsi, les gènes dérégulés sont principalement impliqués dans des voies métaboliques primaires, suggérant que *jouvence* soutient ces activités métaboliques essentielles à la mouche. De plus, les résultats ont montré que *jouvence* influe sur l'homéostasie énergétique de la drosophile. Dans la suite de l'étude, plusieurs méthodes seront déployées afin de mieux définir le rôle de *jouvence* dans l'homéostasie métabolique et énergétique de la mouche.

## **2. Résultats.**

### **2.1. Validation des données obtenues avec le séquençage d'ARN.**

#### **2.1.1. Validation des données de l'analyse transcriptomique par qRT-PCR.**

Afin de confirmer les résultats obtenus lors du séquençage d'ARN, plusieurs gènes de chaque liste établie ont été sélectionnés afin de quantifier par des réactions de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) leur niveau d'expression sur une nouvelle série d'échantillon. Le tableau XI répertorie pour chaque liste les 2% des gènes les plus dérégulés. Les gènes pour lesquels l'analyse transcriptomique a signalé que l'expression était dérégulée positivement (*Cyp4p1*, *Gba1a*, *GstE5*, *LysB*, *MalA1*, *MalA3* et *ninaD*) ou négativement (*CG6296*, *Cyp4p2*, *mthl8* et *RpL37a*) les sont effectivement dans mon étude de validation. Toutefois, pour certains candidats (*Gba1a* et *GstE5*) l'écart entre les niveaux d'expression peut se montrer important pouvant notamment s'expliquer par les différentes techniques et les outils d'analyses utilisés.

Gène	Taux	qPCR	Processus Biologique	Fonction Moléculaire	Composant Cellulaire
<b><i>CG6296</i></b>	-6,92	0,015	Métabolisme des lipides	Lipase ; Phospholipase A1	Espace extracellulaire
<b><i>Cyp4p1</i></b>	1,67	2,47	Oxydation – réduction	Transporteur d'électron	Inconnu
<b><i>Cyp4p2</i></b>	-6,9	0,05	Oxydation – réduction	Transporteur d'électron	Inconnu
<b><i>Gba1a</i></b>	2,27	7,3	Processus métabolique	Glucosyltransférase	Inconnu
<b><i>GstE5</i></b>	2,84	11,25	Processus métabolique	Glutathione transférase	Cytoplasme
<b><i>LysB</i></b>	4,23	4,2	Immunité	Glycoside hydrolase	Espace extracellulaire
<b><i>MalA1</i></b>	1,21	2,02	Métabolisme des carbohydrates	Glycosylhydrolase	Inconnu
<b><i>MalA3</i></b>	1,16	1,91	Métabolisme des carbohydrates	Glycosylhydrolase	Inconnu
<b><i>mth18</i></b>	-7,3	0,05	Processus de longévité	Récepteur couplé aux protéines G	Membranaire
<b><i>ninaD</i></b>	4,75	3,8	Phototransduction	Récepteur de type éboueur	Membranaire
<b><i>RpL37a</i></b>	-7,11	0,41	Traduction	Fixation à l'ARN	Réticulum endoplasmique ; Cytoplasme

**Tableau XI – Les 2% des gènes les plus dérégulés par la mutation *jouvence* dans chaque liste.**

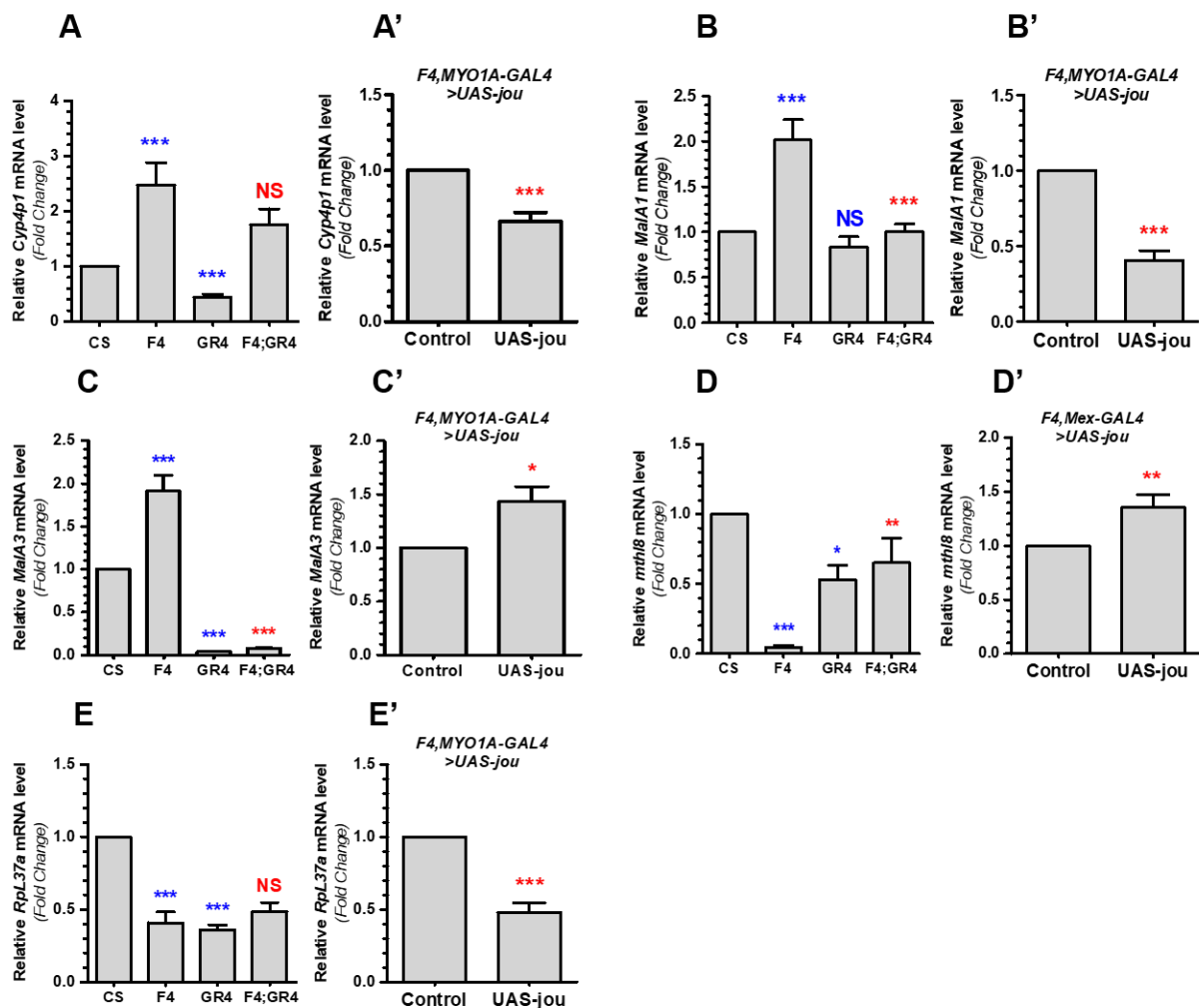
La colonne « Gène » indique le nom du gène étudié selon FlyBase. La colonne « Taux » indique le niveau d'expression relatif du gène mesuré lors du séquençage d'ARN par rapport au contrôle. La colonne « qPCR » indique le taux d'expression du gène candidat mesuré par qRT-PCR à partir d'un lot d'échantillons indépendants comparé à l'expression basale au sein de la lignée contrôle. Les autres colonnes fournissent des informations sur la fonction du gène comme le processus biologique dans lequel il est impliqué, sa fonction moléculaire et dans quel composant cellulaire est-il présent. Dans le cas de plusieurs termes, un seul est présenté.

De plus, nous avons voulu tester si l'expression de ces gènes était améliorée lorsque nous exprimons *jouvence* dans le fond génétique mutant avec les différentes lignées de sauvetage, et ainsi montrer que *jouvence* est directement responsable de leur régulation. L'expression de la majorité des gènes sélectionnés a déjà été présentée dans le premier article (313), les autres sont présentés dans ce chapitre, tels que *Cyp4p1*, *MalA1*, *MalA3*, *mth18* et *RpL37a*. Le niveau d'expression du gène *Cyp4p1* (*Cytochrome P450-4p1*) dans l'intestin des mouches mutantes a considérablement augmenté de 2,5 fois par rapport aux mouches de type sauvage (Fig. 39A). Le sauvetage avec un fragment d'ADN génomique contenant *jouvence* et ses éléments régulateurs endogènes (*F4 ; GR4*) n'a pas permis de restaurer l'expression du *Cyp4p1* dans le fond génétique mutant (Fig. 39A). Ainsi, le sauvetage n'a pas été suffisant pour atténuer les effets de la mutation de *jouvence*. Cependant, une restauration de l'expression du gène est observée chez les mouches avec une expression ciblée de *jouvence* dans les EC (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou*) (Fig. 39A'). De plus, la surexpression de *jouvence* dans le fond génétique de type sauvage (*GR4*) a permis de réguler l'expression du gène *Cyp4p1*, où nous observons une diminution significative du niveau d'ARNm par rapport au contrôle (Fig. 39A).

Concernant les gènes *MalA1* (*Maltase A1*) et *MalA3* (*Maltase A3*), leur niveau d'expression a également fortement augmenté de 2,0 et 1,8 fois, respectivement, suite à la perte de *jouvence* (Fig. 39B et C). Alors que la surexpression de *jouvence* avec la lignée *GR4* ne montre aucune différence avec le contrôle pour le gène *MalA1* (Fig. 39B), le niveau d'expression du gène *MalA3* est, cependant, réduit (Fig. 39C). De plus, la réexpression de *jouvence* avec la lignée *F4 ; GR4* était suffisante pour restaurer l'expression de ces gènes à un niveau équivalent à celui des mouches de type sauvage (Fig. 39B et C). En revanche, l'expression de *jouvence* spécifiquement dans les cellules absorbantes dans le fond génétique mutant avec la lignée *F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou* a permis de rétablir le niveau d'expression du gène *MalA1*, mais pas celui du gène *MalA3* (Fig. 39B' et C').

Les gènes *mth18* (*methuselah-like 8*) et *RpL37a* (*Ribosomal protein L37a*) sont tous deux sous-exprimés chez les mutants (Fig. 39D et E). Alors que le gène *mth18* voit son expression restaurée après une expression ciblée de *jouvence* dans l'épithélium de l'intestin dans le fond génétique mutant (*F4,Mex-GAL4>UAS-jou*) (Fig. 39D'), l'expression du *RpL37a* est, en revanche, encore plus diminuée (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou*) (Fig. 39E'). De plus, un sauvetage de l'expression du gène *RpL37a* n'est pas observé chez les mouches *F4 ; GR4* (Fig. 39E). Par contre, le niveau d'expression du gène *mth18* est rétabli chez ces mouches (Fig. 39D).

Notre étude a révélé que la perte de *jouvence* a fortement perturbé les niveaux d'ARNm d'une panoplie de gènes dans l'intestin et a aussi permis de montrer que *jouvence* est responsable de la régulation de la plupart de ces gènes. Il semble donc que *jouvence* pourrait être un snoARN multifonctionnel. En effet, on ne peut pas exclure le fait que le snoARN *jouvence* ait des fonctions supplémentaires au-delà de son activité canonique dans la maturation et la stabilisation des ARNr. Notamment, nous supposons un rôle potentiel du snoARN dans la régulation de la transcription ou encore dans la structure de la chromatine.



**Figure 39 – Validation par qRT-PCR des gènes dérégulés par la mutation de *jouvence*.**

(A – E) Résultats de qPCR montrant l'expression des gènes suivants dans les intestins entiers des génotypes indiqués âgés de 5 jours (n = 3, 40 intestins par groupe) : *Cyp4p1* (A et A'), *MalA1* (B et B'), *MalA3* (C et C'), *mth18* (D et D') et *Rpl37a* (E et E'). L'expression a été normalisée à l'expression du gène  $\alpha Tub-84B$ . Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (CS) sont affichées en rouge, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (F4) ou le contrôle génétique (*F4,MYO1A-GAL4*>F4 ou *F4,Mex-GAL4*>F4) sont affichées en bleu.

### 2.1.2. La modulation des niveaux des gènes dérégulés par la mutation de *jouvence* influence la durée de vie de l'organisme.

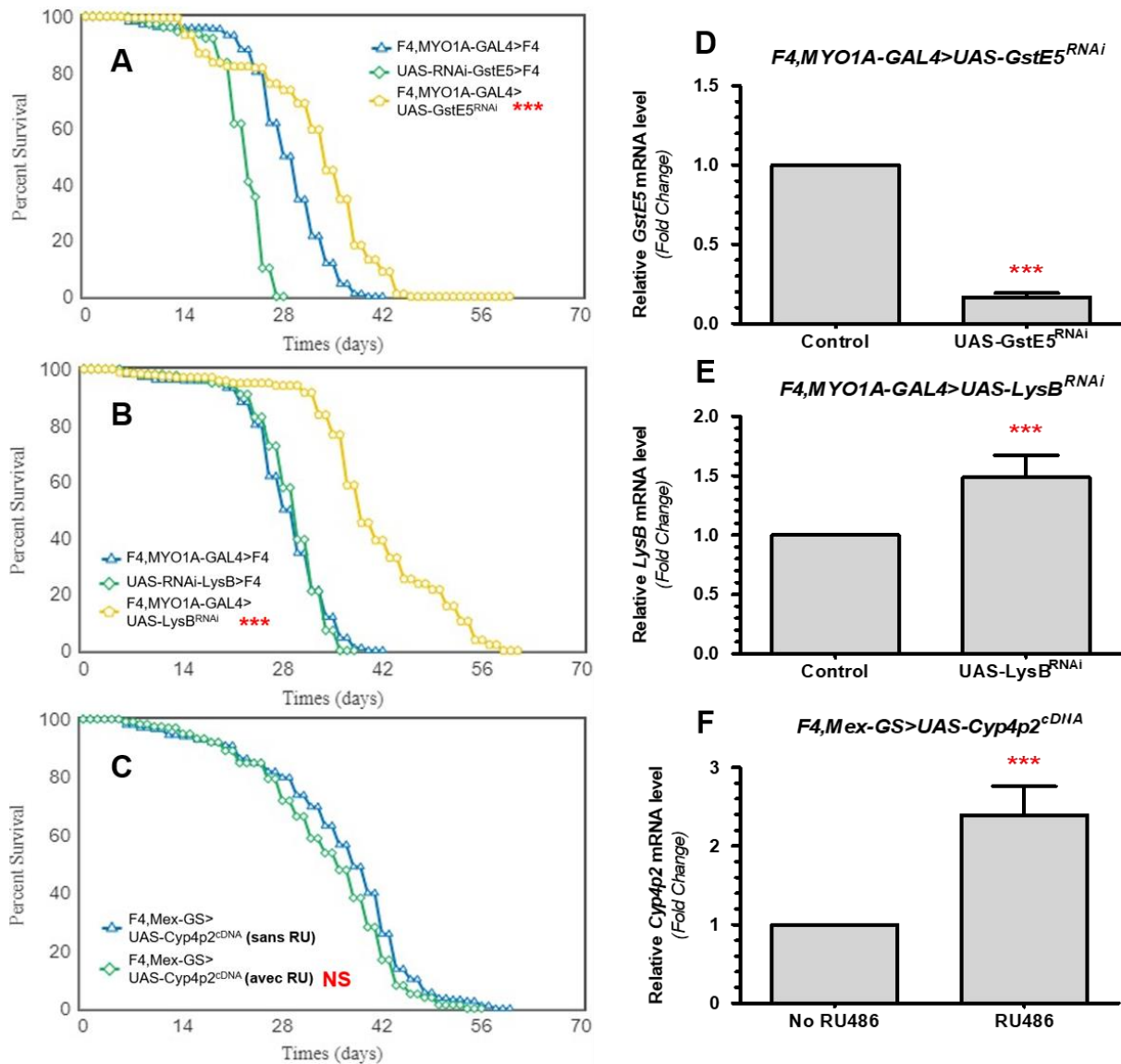
Pour déterminer l'importance de ces gènes dans l'intestin, nous avons utilisé une lignée pilote GAL4 spécifique de l'épithélium de l'intestin (*MYO1A-GAL4* ou *Mex-GAL4-GS*) pour exprimer les différents transgènes *UAS-RNAi* ou *UAS-cDNA* ciblant les gènes sélectionnés de l'analyse transcriptomique. Pour chaque gène, nous avons testé la longévité des mouches par rapport à celle des mutants. Précédemment, nous avons mis en évidence un lien génétique et moléculaire entre l'effet de *jouvence* sur certains gènes dérégulés et la



durée de vie. Il a été montré que la remise à niveau des gènes dérégulés (*ninaD* et *CG6296*) dans le fond génétique mutant par l'expression ciblée soit d'un ARNi soit d'un ADNc dans l'intestin permettait d'augmenter la durée de vie des mouches mutantes (313). La même démarche expérimentale a alors été faite sur d'autres gènes dérégulés, identifiés lors du séquençage d'ARN. Nous avons ainsi analysé l'impact des gènes *Cyp4p2*, *GstE5* et *LysB* sur la longévité.

Nous avons montré que les gènes *GstE5* et *LysB* sont surexprimés chez les mutants. Cependant, l'expression ciblée d'un ARNi (*UAS-RNAi-GstE5* et *UAS-RNAi-LysB*) dans les EC avec la *MYO1A-GAL4* prolonge significativement la durée de vie des mutants *F4* par rapport aux individus contrôles. En effet, les mouches transgéniques *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-GstE5* et *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-LysB* voient leur durée de vie augmenter de 21 et 39%, respectivement (Fig. 40A et B). Plus précisément, 50% des mouches mutantes pour *jouvence* avec une expression intestinale ciblée de l'*UAS-RNAi-GstE5* (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-GstE5*) vivent jusqu'à 34 jours (39 jours pour les *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-LysB*), tandis que l'un de leurs contrôles génétiques *F4,MYO1A-GAL4>F4* ne survivent pas au-delà de 36 jours avec 50% de mortalité à 28 jours après éclosion (Tabl. S1). Ceci suggère un rôle crucial de ces gènes dans la capacité de survie des drosophiles, mais qui n'est pas exclusif à tous les gènes dérégulés, puisque les individus *F4,Mex-GAL4-GS>UAS-cDNA-Cyp4p2* ne vivent pas aussi longtemps que les contrôles. Les résultats montrent que ces mouches ont la même durée de vie que celle des mouches non induites (Fig. 40C). Le même constat avait déjà été fait avec le gène *Gba1a* (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Gba1*) (6). De plus, des qRT-PCR sur *Cyp4p2*, *GstE5* et *LysB* ont été réalisés pour confirmer l'augmentation ou la diminution du niveau d'expression de ces gènes dans le fond génétique mutant suite à l'action respective de l'ADNc ou de l'ARNi chez ces génotypes (Fig. 40D, E et F). Curieusement, nous avons observé une augmentation significative du niveau en ARNm de *LysB* après l'expression d'un ARNi (Fig. 40E).

Ces résultats démontrent que la restauration de l'expression de certains gènes dérégulés peut prolonger la durée de vie de la mouche. Cette étude montre que *jouvence* influence la longévité des mouches avec l'implication de ces gènes dérégulés dans l'intestin.



**Figure 40 – Effet de la modulation de l’expression des gènes dérégulés sur la longévité.**

**(A)** Longévités des mouches transgéniques *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-GstE5* (n = 213 femelles) comparées à leurs contrôles génétiquement appariés *F4,MYO1A-GAL4>F4* (n = 312 femelles) et *UAS-RNAi-GstE5>F4* (n = 256 femelles). **(B)** Courbes de survie en fonction de l’âge déterminées chez des mouches transgéniques *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-LysB* (n = 240 femelles) et de leurs contrôles génétiques *F4,MYO1A-GAL4>F4* (n = 312 femelles) et *UAS-RNAi-LysB>F4* (n = 223 femelles). **(C)** Analyse de la survie des mouches femelles transgéniques *F4,Mex-GAL4-GS>UAS-cDNA-Cyp4p2* induites au RU486 (n = 238 femelles) par rapport aux mouches contrôles non induites (n = 198 femelles). Les différences significatives entre les lignées et leurs contrôles respectifs ont été déterminées en utilisant le test du Log-rank avec le logiciel d’analyse OASIS (\*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001). Des statistiques complètes, comprenant le nombre d’individus analysés, médiane, moyenne et durée de vie maximale pour toutes les expériences, sont présentées dans le tableau SI. **(D – F)** Niveaux d’ARNm relatifs des gènes suivants analysés par RT-PCR en temps réel : *Cyp4p2* **(D)**, *GstE5* **(E)** et *LysB* **(F)**. Les ARN totaux ont été collectés à partir d’intestins entiers des génotypes mentionnés âgés de 7 jours (n = 2, 40 intestins par groupe). L’expression a été normalisée à l’expression du gène  $\alpha Tub-84B$ . Les barres d’erreur représentent l’erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

## 2.2. La perte de *jouvence* altère l'expression de gènes impliqués dans des processus métaboliques lipidiques.

Pour davantage identifier les voies métaboliques régulées par *jouvence* au niveau transcriptomique dans l'intestin, nous avons analysé par qRT-PCR le profil d'expression de gènes majoritairement impliqués dans le métabolisme lipidique (*FAS*, *FATP*, *FOXO*, *InR*, *lip4*, *MAGRO* et *MTTP*), dont la plupart ont été sélectionnés de l'article (316). Nous avons montré précédemment que le processus métabolique lipidique est une des voies les plus affectées par la mutation de *jouvence*. Le tableau XII présente les différents gènes testés dans cette étude et leurs caractéristiques fonctionnelles. L'expression de l'enzyme clé de la lipogenèse, *FAS* (*Fatty Acids Synthase*), est fortement diminuée chez les mutants (Fig. 41A). Cependant, la surexpression de *jouvence* a augmenté le niveau en ARNm du gène *FAS* dans l'intestin par rapport aux individus contrôles (Fig. 41A). Le niveau d'expression du gène a en outre été restauré quand *jouvence* a été ré-exprimé avec la lignée de sauvetage *F4 ; GR4* (Fig. 41A). Cependant, une expression ciblée de *jouvence* dans les EC (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou*) dans le fond génétique mutant n'a pas permis de rétablir l'expression du gène *FAS* mais au contraire à provoquer une diminution plus marquée de son niveau d'expression (Fig. 41A'). Ce résultat, quelque peu inattendu, laisse penser qu'un (ou les deux) des deux autres snoARN (*sno2* et/ou *sno3*) pourrait participer à cet effet. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour d'élucider ce point.

Le gène *FATP* (*Fatty Acid Transport Protein*), codant pour une protéine de transport des AG à longue chaîne, a vu son expression déréguler dans l'intestin suite à la perte de *jouvence* (Fig. 41B). Nous avons constaté que dans des conditions de surexpression de *jouvence*, le niveau en ARNm du gène est supérieur à celui des mouches de type sauvage (Fig. 41B). De plus, les mouches transgéniques ré-exprimant *jouvence* dans le fond génétique mutant montrent une expression du gène *FATP* restaurer avec les lignées *F4 ; GR4* (Fig. 41B), et également lorsqu'il est conduit par la lignée pilote d'expression intestinal *MYO1A-GAL4* (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou*) (Fig. 41B'). Ce résultat suggère que le gène *FATP* est probablement directement régulé par *jouvence*.

Les gènes *MAGRO*, une estérase et lipase intestinale, et *MTTP* (*Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein*), une protéine de transfert des lipides et du cholestérol, sont sous-exprimés chez les mutants (Fig. 41F et G). Par contre, le sauvetage de *jouvence* avec la lignée *F4 ; GR4* a restauré le niveau d'expression du gène *MTTP* dans le phénotype mutant (Fig. 41G), mais pas celui du gène *MAGRO* (Fig. 41F). Cependant, lorsque l'expression de *jouvence* est conduite par la lignée pilote *MYO1A-GAL4* spécifique des EC, les mouches transgéniques *F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou* voient l'expression des deux gènes sauver (Fig. 41F' et G').

De plus, l'expression de la lipase intestinale, *lip4* (*lipase 4*), qui contrôle la digestion des lipides alimentaires, est aussi affectée par la mutation de *jouvence*. En effet, son niveau d'expression est augmenté chez les mouches dépourvues de *jouvence* (Fig. 41E). Cependant, la régulation de l'expression du gène *lip4* semble être plus complexe puisque la réexpression de *jouvence* avec les lignées *F4 ; GR4* (Fig. 41E) ou

*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou* (Fig. 41E') provoque, au contraire, une accentuation de l'élévation de son niveau d'expression par rapport aux phénotypes mutant.

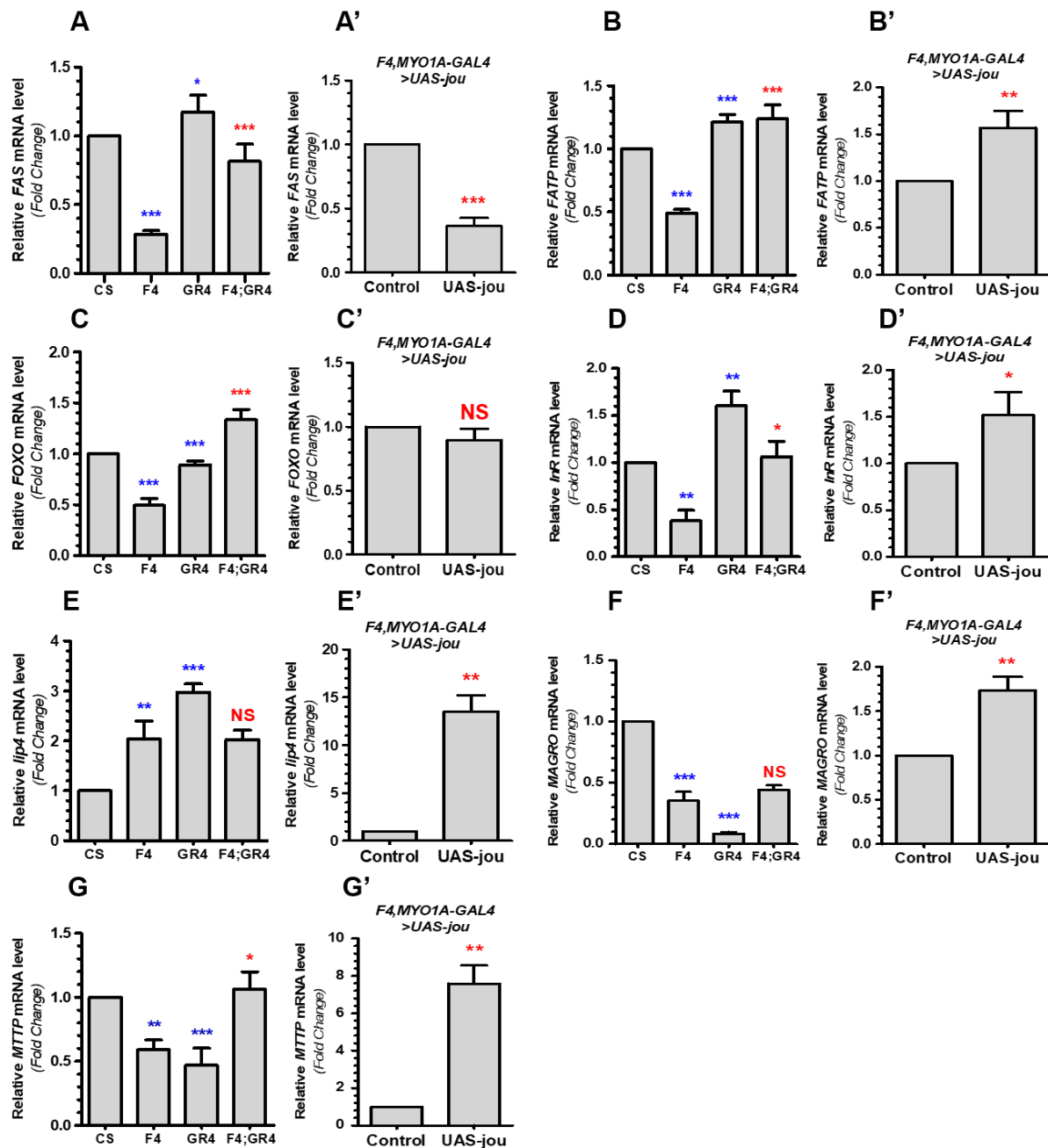
De plus, les niveaux d'expression du facteur de transcription *FOXO* (*Forkhead box, sub-group O*) et du récepteur à l'insuline, *InR* (*Insulin Receptor*), dans l'intestin sont régulés à la baisse, ce qui suggère que *jouvence* affecte aussi la voie signalisation de l'insuline dans l'intestin (Fig. 41C et D). Nous avons montré que le niveau d'ARN du gène *InR* est restauré chez les mouches *F4; GR4* (Fig. 41D), ce qui n'est pas le cas pour le gène *FOXO* (Fig. 41C). En revanche chez les mouches *MYO1A-GAL4* exprimant *jouvence* dans le fond génétique mutant (*F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou*) spécifiquement dans l'épithélium intestinal, l'expression des deux gènes est rétablie (Fig. 41C' et D').

Malgré leur dérégulation dans l'intestin des mouches mutantes pour *jouvence*, ces gènes ne sont pas sortis « directement » lors de l'analyse transcriptomique sans doute dû à un fold-change fixé à 2. En effet, lorsqu'on examine de plus près les résultats « DEG » du séquençage d'ARN, certains de ces gènes sont statistiquement différents, mais ne le sont plus lors de l'ajustement statistique (padj), ce qui suggère qu'ils sont dérégulés mais à la limite. De plus, d'autres gènes « pertinents », que nous n'avons pas examinés lors de cette première série d'expériences, se sont avérés *a posteriori* différents dans ce contexte, comme par exemple le *Dilp3*, qui est sous-exprimé (voir plus loin dans le chapitre 4), tandis que le *Dilp4* est sur-exprimé. Les résultats obtenus indiquent alors que *jouvence* régule le métabolisme lipidique intestinal. En effet, nous avons démontré que *jouvence* a un impact marqué sur l'expression des gènes impliqués dans des fonctions digestives et dans le métabolisme lipidique. Ainsi, nos résultats suggèrent que *jouvence* a un impact sur l'état nutritionnel et métabolique de la mouche, deux paramètres physiologiques clés contribuant à la forme physique de la drosophile.

<b>Gène</b>	<b>qPCR</b>	<b>Processus Biologique</b>	<b>Fonction Moléculaire</b>	<b>Composant Cellulaire</b>
<b><i>FAS</i></b>	0,29	Processus métabolique	Hydrolase	Inconnu
<b><i>FATP</i></b>	0,49	Métabolisme des lipides	Transporteur	Système endomembranaire
<b><i>FOXO</i></b>	0,49	Régulation de la transcription (voie de signalisation de l'insuline/IGF)	Facteur de transcription	Noyau
<b><i>InR</i></b>	0,38	Voie de signalisation de l'insuline/IGF	Récepteur transmembranaire	Transmembranaire
<b><i>lip4</i></b>	2,04	Inconnu	Hydrolase	Inconnu
<b><i>MAGRO</i></b>	0,36	Métabolisme du cholestérol et des TG	Estérase ; Lipase	Cytoplasme
<b><i>MTTP</i></b>	0,59	Métabolisme des lipoprotéines	Transporteur	Système endomembranaire

**Tableau XII – Gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dont l'expression est modulée dans l'intestin par la mutation de *jouvence*.**

La colonne « Gène » indique le nom du gène étudié selon FlyBase. La colonne « qPCR » indique le niveau d'expression du gène mesuré par qRT-PCR à partir d'un lot d'échantillons indépendants comparé à l'expression basale au sein de la lignée contrôle. Les autres colonnes fournissent des informations sur la fonction du gène comme le processus biologique dans lequel il est impliqué, sa fonction moléculaire et dans quel composant cellulaire est-il présent. Dans le cas de plusieurs termes, un seul est présenté.



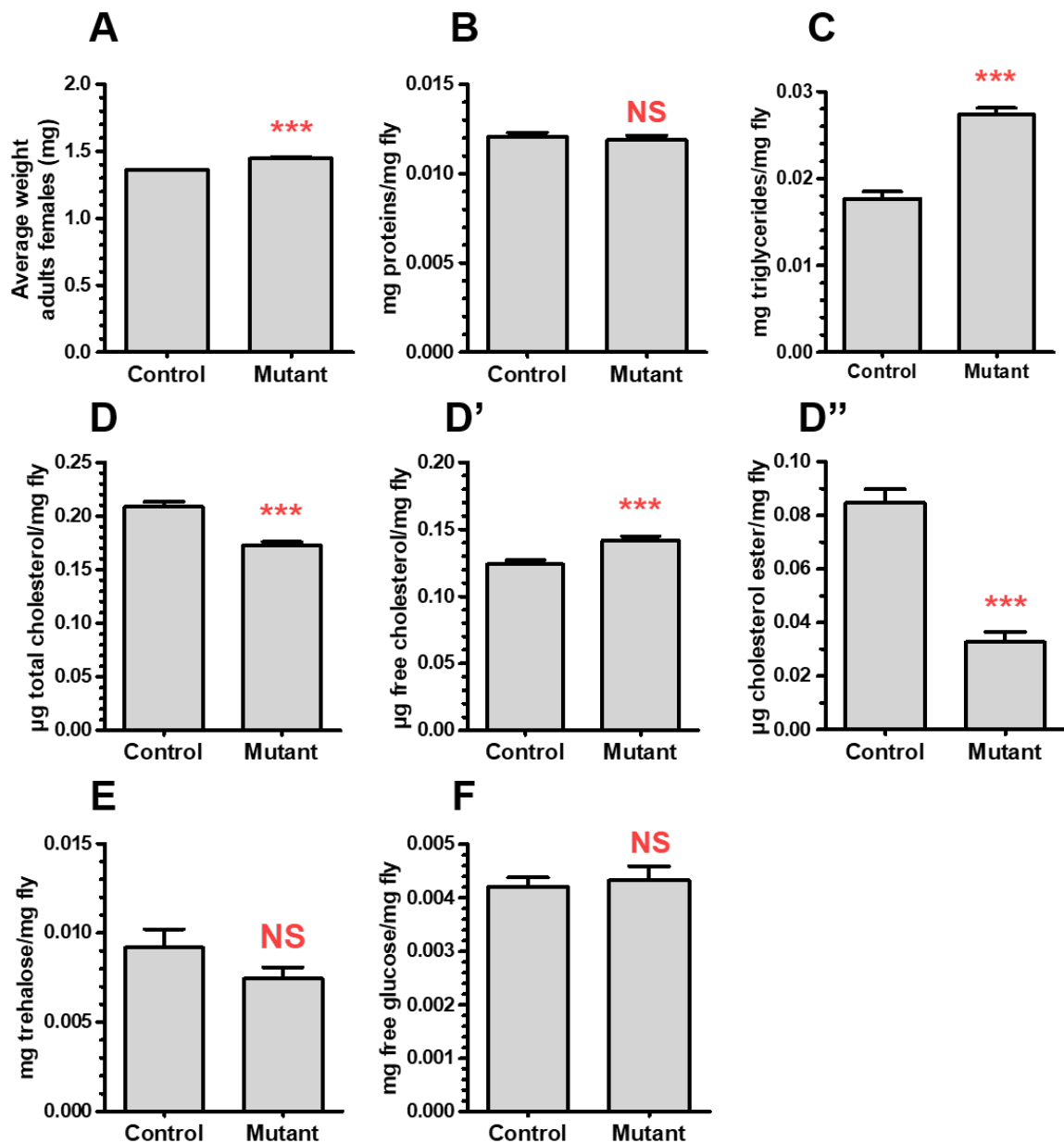
## 2.3. Evaluation du profil métabolique.

### 2.3.1. Les mouches sans *jouvence* présentent des défauts métaboliques.

Jusqu'ici, nous avons montré que *jouvence* régule l'expression d'un certain nombre de gènes dans l'intestin principalement impliqués dans des voies métaboliques essentielles pour la drosophile. Les premiers résultats suggèrent, notamment, que l'homéostasie métabolique des mutants est altérée. Avant d'entamer toutes expérimentations, nous avons d'abord procédé à la pesée des mouches. Le poids corporel sert d'indicateur critique de l'état énergétique de l'individu et tout changement anormal du poids corporel peut être le premier signe crucial pour souligner la différence des niveaux d'énergie. Les résultats révèlent que les mouches déficientes pour *jouvence* sont plus grosses par rapport aux contrôles (Fig. 42A). Cette obésité pourrait s'expliquer par une accumulation excessive de graisses potentiellement due à des perturbations dans le métabolisme des lipides. Ainsi, ces premiers résultats renforcent le fait que les niveaux des principales macromolécules sont modifiés chez les mutants et confirment que la perte de *jouvence* provoque bien des altérations métaboliques.

Afin d'évaluer l'impact de la dérégulation de ces gènes sur l'homéostasie métabolique et caractériser la raison probable de cette augmentation de poids induite par la perte d'expression de *jouvence*, nous avons décidé de mesurer les niveaux des principaux métabolites, tels que le cholestérol, le glucose libre, le tréhalose ou encore les TG sur des mouches adultes de 7 jours. En utilisant des tests enzymatiques, nous avons d'abord observé que les niveaux de cholestérol total en l'absence de *jouvence* sont clairement et systématiquement diminués de 14% par rapport au type sauvage (Fig. 42D). Or, le dosage du cholestérol est une réaction couplée à une enzyme qui permet la mesure séparée du cholestérol libre et des esters de cholestérol dans l'échantillon. Nous avons ainsi observé qu'il y a une augmentation significative du cholestérol libre de 12% (Fig. 42D') mais une diminution considérable des esters de cholestérol de plus de 62% (Fig. 42D''). De plus, la perte de *jouvence* conduit également à une augmentation significative du niveau de TG (Fig. 42C). Le taux de TG total quantifié chez les mutants est plus de 1,5 fois supérieur à celui des mouches de type sauvage de même âge. Cependant, il n'y a pas eu d'impact sur les niveaux de tréhalose (Fig. 42E) et de glucose libre (Fig. 42F), même si une légère tendance à la baisse est observée dans les niveaux de tréhalose des mutants nuls pour *jouvence*. En parallèle, nous avons déterminé en outre les niveaux de protéines par la méthode de Bradford. Les mutants présentent un niveau similaire à celui des mouches contrôles (Fig. 42B).

Dans cette étude, nous avons observé que la perte de *jouvence* a engendré l'apparition d'un large éventail d'anomalies métaboliques, telles qu'une prise de poids, une perturbation des niveaux de TG et une altération dans l'homéostasie du cholestérol. Ainsi, ces divers défauts métaboliques répertoriés à la suite de la mutation de *jouvence* sont probablement liés à la dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides révélée à l'issue de l'analyse transcriptomique.



**Figure 42 – Caractérisations physiologiques des mutants délétés pour *jouvence* dans des conditions d'alimentation normales.**

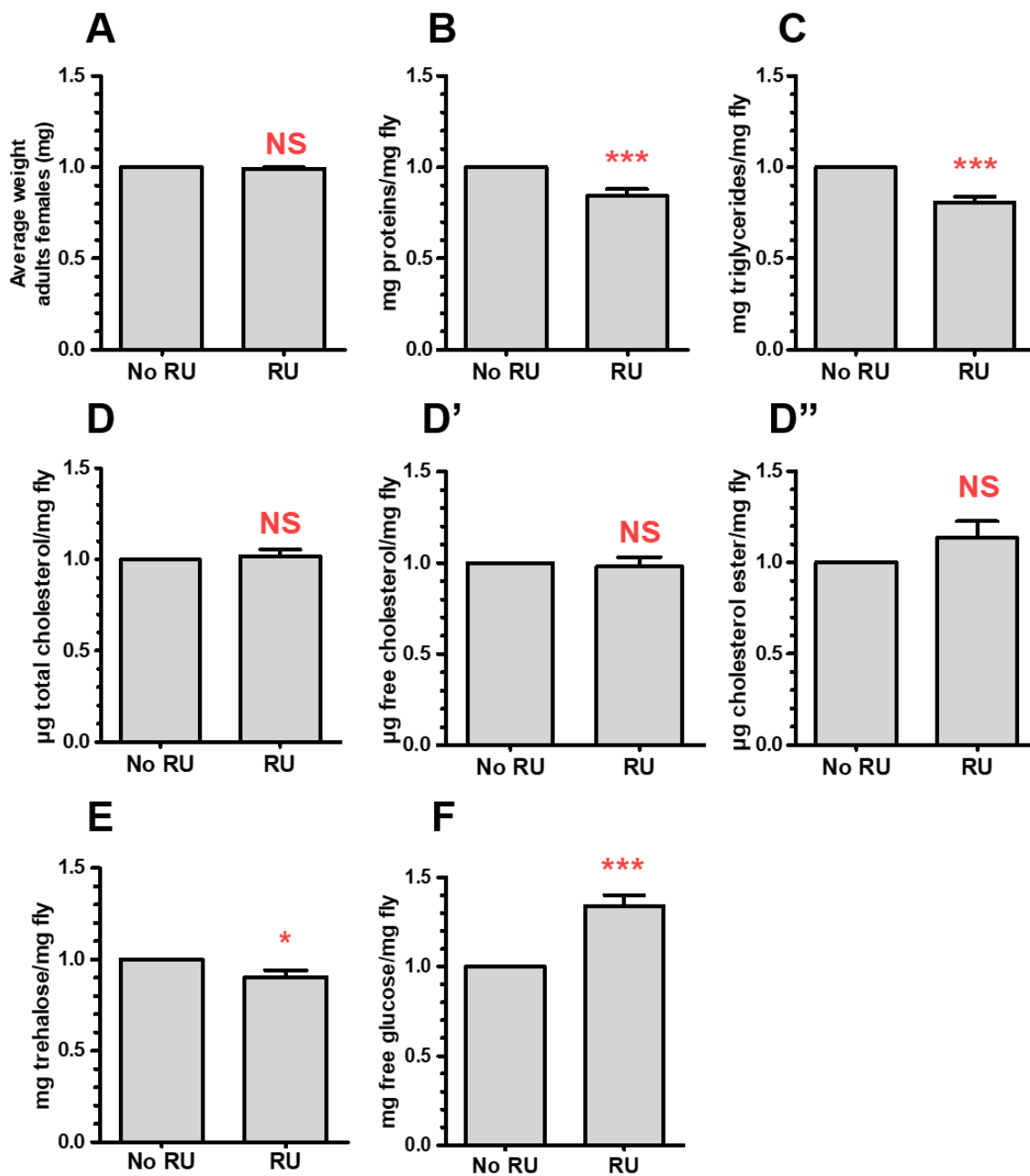
(A) Masse corporelle moyenne (mg) d'une mouche (n = 154 mouches par génotype). (B) Niveau total de protéines (n = 119 mouches par génotype). (C) Mesure de la teneur en TG total (n = 35 mouches par génotype). (D) Niveau de cholestérol total (n = 35 mouches par génotype). Le cholestérol libre (D') et les esters de cholestérol (D'') ont été mesurés séparément. (E) Détermination des niveaux de tréhalose (n = 44 mouches par génotype). (F) Quantification du niveau de glucose libre (n = 40 mouches par génotype). La quantification des différents paramètres métaboliques et des protéines ont été réalisées sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre les génotypes de type sauvage et mutant. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d'une mouche. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.



### 2.3.2. Effet de l'expression de *jouvence* dans l'intestin sur l'homéostasie métabolique.

Nous avons montré que la perte de *jouvence* a entraîné des perturbations métaboliques importantes chez la mouche. En utilisant le même procédé expérimental mentionné précédemment, nous avons ciblé l'expression de *jouvence* dans l'épithélium intestinal au stade adulte en utilisant la lignée pilote inductible à la mifépristone (RU486), *Mex-GAL4-GS (F4, Mex-GAL4-GS>UAS-jou)*, pour étudier si la ré-expression de *jouvence* dans l'intestin sauve les défauts métaboliques. Pour commencer, les mouches exprimant *jouvence* dans les cellules épithéliales intestinales n'affichent pas de différence significative sur leur poids (Fig. 43A). Cependant, nous avons observé que leur teneur en TG a partiellement été sauvée (Fig. 43C). De plus, l'évaluation de leur niveau en glucides a révélé des niveaux de glucose libre significativement élevés par rapport aux mouches non induites au RU486 (Fig. 43F). Nous avons également quantifié les niveaux de tréhalose et trouvé que les niveaux de tréhalose des mouches transgéniques exposées au RU486 ont légèrement diminués par rapport à ceux des mutants (Fig. 43E). L'expression induite de *jouvence* avec cette lignée pilote n'a pas en outre amélioré les quantités de cholestérol (Fig. 43D). De plus, les résultats ont aussi révélé des niveaux de protéines significativement bas, alors qu'aucune différence n'avait été signalée chez les mutants (Fig. 43B). Ainsi, l'expression de *jouvence* dans l'intestin entraîne une modulation considérable de la plupart des paramètres évalués.

A partir de ces résultats, nous suggérons qu'une expression exclusive de *jouvence* dans l'intestin peut efficacement atténuer l'accumulation excessive de gras chez les mutants. De plus, ces données supportent ainsi l'idée que *jouvence* remplit une fonction essentielle dans le maintien de l'homéostasie métabolique lipidique de la mouche. Cependant, cette expression ciblée du snoARN dans l'intestin n'a pas été suffisante ou assez précise pour rétablir les niveaux de cholestérol, car, pour rappel, l'expression ciblée de *jouvence* avec le *Mex-GAL4-GS* augmente de façon importante la quantité de *jouvence*, et donc potentiellement dérégule d'autres gènes. Ceci suggère que d'autres éléments rentrent en jeu pour restaurer complètement le phénotype mutant face à ces diverses anomalies métaboliques. Par contre, la réexpression de *jouvence* dans l'épithélium de l'intestin a provoqué des fluctuations dans les niveaux de tréhalose, glucose et protéines qui n'ont pas été initialement observées chez les mutants.



**Figure 43 – Modulation du poids corporel et de l’activité métabolique par l’expression de *jouvence* dans l’épithélium intestinal (*F4,Mex-GAL4-GS>UAS-jou* induit ou non au RU486).**

(A) Masse corporelle moyenne (mg) d’une mouche (n = 70 mouches par génotype). (B) Niveau total de protéines (n = 55 mouches par génotype). (C) Mesure de la teneur en TG total (n = 15 mouches par génotype). (D) Niveau de cholestérol total (n = 15 mouches par génotype). Le cholestérol libre (D’) et les esters de cholestérol (D’’) ont été mesurés séparément. (E) Détermination des niveaux de tréhalose (n = 20 mouches par génotype). (F) Quantification du niveau de glucose libre (n = 20 mouches par génotype). La quantification des différents paramètres métaboliques et des protéines ont été réalisées sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre les génotypes de type sauvage et mutant. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d’une mouche. Les barres d’erreur représentent l’erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

### 3. Discussion.

#### 3.1. Les mutants *jouvence* présentent un phénotype d'obésité.

Lors de l'étude sur la localisation anatomique de l'expression du snoARN *jouvence*, nous avons constaté qu'il est exprimé dans les cellules épithéliales de l'intestin (313). Cet organe est connu pour être particulièrement important dans la régulation du métabolisme énergétique, puisqu'il contrôle l'apport énergétique et sert également à emmagasiner le surplus d'énergie sous forme de lipides (306). Cependant, une perturbation dans la fonction des EC, cellules nécessaires à l'absorption des nutriments et à la fonction immunitaire innée dans l'épithélium intestinal, peut entraîner des modifications du métabolisme lipidique à l'échelle de l'organisme. Ici, nous avons justement montré que la mutation de *jouvence* conduit à des défauts métaboliques avec une augmentation du poids corporel et un niveau de TG anormalement élevé (Fig. 42A et C). Cette élévation dans la quantité de TG a été corroborée par diverses colorations histologiques. En utilisant un colorant à l'huile rouge (Oil-Red-O), qui colore les lipides neutres comme les TG, nous avons observé une plus grande quantité de lipides dans l'abdomen (données non présentées) et dans l'intestin des mutants par rapport aux mouches contrôles (Fig. 3G et H dans l'article du chapitre 3). Le même constat a été fait sur des intestins marqués au Nile Red, qui colore les gouttelettes lipidiques intracellulaires (Fig. 50A et B). Le stockage intracellulaire des TG se fait alors dans des compartiments cytoplasmiques spécialisés, les gouttelettes lipidiques (304). Presque tous les tissus peuvent synthétiser et stocker les TG dans de petites gouttelettes de lipides, mais les adipocytes, les cellules de base du corps gras, restent toutefois les cellules spécialisées dans le stockage des lipides (304). Les colorations au Nile Red ont montré que les EC des modèles mutants abritent des gouttelettes lipidiques plus denses et en plus grand nombre au début de la R2 et de la R4 comparés aux mouches de type sauvage (Fig. 50A et B). Or, une étude a supporté l'idée que ces régions riches en gouttelettes lipidiques sont sujettes aux tumeurs (261). De plus, il a été proposé qu'un dysfonctionnement métabolique prolongé (augmentation de l'incidence de l'obésité) provoque une intensification et une accélération des processus inflammatoires avec un risque croissant de développer un cancer (79). Ainsi, cette altération dans l'homéostasie énergétique peut probablement expliquer le taux de prolifération élevé des CSI et l'accumulation de cellules différenciées observés chez les mouches dépourvues de *jouvence* dès le plus jeune âge. En revanche, nous avons montré que la réexpression de *jouvence* spécifiquement dans l'épithélium de l'intestin est suffisant pour rétablir les niveaux de TG à la normale, accompagné d'une perte de poids significative (Fig. 43A et C). De plus, il serait aussi judicieux d'envisager d'évaluer la consommation alimentaire des mouches mutantes afin de comprendre si ce gain de poids par rapport aux mouches contrôles peut être attribué à leur comportement alimentaire.

Chez la drosophile, le métabolisme des graisses est essentiel pour maintenir l'homéostasie énergétique. Les mouches utilisent les réserves lipidiques pour améliorer leur état énergétique, notamment pendant la

diapause pour fournir de l'énergie à l'embryon en développement, pour alimenter les périodes de vol prolongées, ou encore en vue de la reproduction (304). En effet, le développement des œufs implique une mobilisation importante des réserves du corps gras vers les ovaires (304). De plus, les AG servent également de précurseurs dans la synthèse des eicosanoïdes et des phéromones (304). Afin de maintenir l'homéostasie énergétique, un équilibre constant est maintenu entre la dégradation et la synthèse des lipides. Or, des perturbations dans le métabolisme des graisses peuvent entraîner des changements dramatiques dans les niveaux de TG et, par conséquent, une gamme de troubles physiologiques, tels que l'obésité, le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires (328). En effet, l'excès de nutriments à long terme peut provoquer un changement au niveau des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme énergétique. Lorsque les nutriments sont abondants, les graisses alimentaires sous forme de TG sont décomposées en AG dans l'intestin moyen par les lipases gastriques. Ces AG sont ensuite absorbés par les EC et transportés vers le RE, où ils sont resynthétisés sous forme de TG, qui s'accumulent entre les feuillettes de la membrane du RE. Ces amas de TAG finissent, soit par être bourgeonnés pour former des gouttelettes de stockage de lipides, soit par être conditionnés en particules de lipoprotéines (lipophorines) dans la lumière du RE pour être transportés par l'hémolymphe vers le corps gras pour y être stockés ou vers d'autres organes pour y être catabolisés. Ces réserves de TG restent accessibles en cas de privation de nutriments par l'action de lipases spécifiques associées aux gouttelettes lipidiques (ex : brummer) qui libèrent les AG pour la production d'énergie par  $\beta$ -oxydation (304). Ainsi, le métabolisme lipidique est sous la régulation d'un très grand nombre de gènes. Plusieurs de ces gènes régulent l'emmagasinage des lipides (lipogenèse), tandis que d'autres régulent la mobilisation des graisses emmagasinées (lipolyse) pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme.

Une série d'études utilisant des dosages métaboliques et des colorations histologiques a révélé que les mouches mutantes pour *jouvence* accumulent plus de lipides que leurs contrôles. Il semblerait que ces mouches soient défectueuses dans leur capacité à mobiliser les lipides stockés, ainsi l'équilibre entre l'énergie absorbée et la dépense énergétique est perturbé. Nous supposons que ce phénotype est probablement lié à des changements transcriptionnels dans les voies métaboliques des gènes suite à la perte de *jouvence*. Effectivement, ce modèle a été soutenu par un séquençage d'ARN, qui ont montré que de nombreux gènes exprimés dans l'intestin moyen sont dérégulés chez les mutants *jouvence*. La dérégulation de gènes spécifiques a alors provoqué un apport énergétique supérieur et les surplus sont donc emmagasinés sous forme de lipides. L'analyse transcriptomique a été menée afin de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels *jouvence* régule l'homéostasie lipidique. Cette étude a révélé que 633 gènes sont significativement affectés par la mutation de *jouvence* chez les mouches adultes, avec 314 gènes affichant des niveaux d'expression accrus et 319 gènes montrant des niveaux d'expression réduits (313). Des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique sont surreprésentés dans la liste des gènes dérégulés par la perte de *jouvence* (313). Selon nos résultats, il semble que le processus de stockage soit affecté par la perte de *jouvence*, puisque nous avons observé des différences significatives dans l'expression de gènes impliqués dans ce processus. Par exemple, la mutation de *jouvence* a entraîné la régulation positive d'un gène nécessaire à la lipogenèse dans

l'intestin, *midway* (329). Ceci pourrait en partie expliquer que la régulation à la hausse du gène *midway* puisse contribuer à la capacité élevée des mutants à emmagasiner les TG au niveau de l'intestin. D'autre part, il semble avoir une différence significative dans l'expression de gènes essentiels à l'oxydation des lipides. Par exemple, l'expression du gène *Lsd-1/PLIN1*, un membre de la famille des Périlipines, est fortement diminuée chez les mouches mutantes. Le gène *Lsd-1* code pour une protéine impliquée dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (309). Elle favorise l'accès des lipases TG à la surface des gouttelettes lipidiques, permettant ainsi la mobilisation des lipides de stockage. Les mouches dépourvues de *jouvence* sont donc capables de prendre en charge l'excès de nutriment et l'emmagasiner sous forme de lipides, mais la mobilisation de ces lipides pourrait être altérée à cause de la diminution de l'expression de ces gènes, ce qui augmenterait les niveaux de TG. L'analyse transcriptomique a en outre révélé la dérégulation dans l'expression de gènes codant pour des protéines de transport. Ces transporteurs permettent d'assurer le transfert des lipides à l'intérieur des EC (ex : SR-BI, CD36, FATP, etc...). Les mutants ont notamment montré une régulation à la hausse de certains transporteurs, tels que *ninaD* et *CG31741*, des orthologues du SR-BI/CD36 humain, ou encore *CG17929* qui a une activité de transporteur transmembranaire. Leur surexpression peut ainsi conduire à une augmentation de l'absorption des lipides. En parallèle, d'autres données ont révélé une perturbation de la voie de signalisation de l'insuline/IGF, un système impliqué dans le contrôle de l'homéostasie métabolique. Nous avons en l'occurrence observé une régulation négative de l'expression du facteur de transcription *FOXO*. Chez la drosophile et les mammifères, *FOXO* régule une batterie de gènes impliqués dans le contrôle métabolique, avec notamment la transcription des lipases nécessaires à la lipolyse des lipides stockés, ainsi que l'expression des enzymes et d'autres facteurs de transcription impliqués dans le catabolisme lipidique. En effet, son activation dans l'épithélium intestinal est nécessaire pour inhiber l'expression de lipases conservées à cours de l'évolution, et ainsi d'empêcher une absorption excessive de lipides, mais permet aussi de prolonger la durée de vie (330). De même, l'analyse transcriptomique a révélé une augmentation significative du niveau de *Dilp4*. Cependant, son rôle dans l'intestin reste à être éclairci, toutefois une activité modifiée de l'IIS est associée à un métabolisme lipidique anormal (330) (331). Ainsi, nos résultats permettent éventuellement de définir un mécanisme distinct du snoARN *jouvence* dans lequel l'homéostasie métabolique est altérée par la dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline/IGF après la perte de *jouvence*.

Comme mentionné ci-dessus, les calories excédentaires provenant d'un bilan énergétique positif sont stockées sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques monoculaire. Cependant, ce système a une limite de saturation, et un excès de calories sur une longue période peut entraîner le dépôt de TG et d'autres lipides plus toxiques dans des tissus non adipeux (autour de l'intestin, des gonades et de l'hypoderme), ce qui entraîne une lipotoxicité et une inflammation (332). Il a été montré que les lipides stockés dans les tissus non adipeux, c'est-à-dire l'accumulation de lipides ectopiques, jouent un rôle majeur dans la pathogenèse des maladies liées à l'obésité (332). Outre la composition des lipides qui peut jouer sur la longévité des mouches, les dépôts ectopiques peuvent également avoir un impact sur celle-ci (332). Ce phénomène a notamment été expliqué

par les effets des AG libres ou de leurs métabolites sur les voies de signalisation, ou leurs effets sur la perméabilité membranaire des mitochondries (332). Il est aussi possible qu'un excès d'AG libres cause un stress oxydatif pouvant endommager les composants cellulaires (332). Ainsi, ces différents phénomènes pourraient potentiellement expliquer les effets provoqués par la mutation de *jouvence* sur la perte de l'homéostasie tissulaire (dysplasie intestinale), ainsi que la réduction de la durée de vie.

On ne peut pas non plus négliger le fait que des variations dans la composition de la flore intestinale, même subtiles, peuvent avoir des conséquences lourdes sur l'activité métabolique des mouches. En effet, des dérèglements dans le microbiote intestinal peuvent contribuer à la pathophysiologie de maladies métaboliques chroniques, telles que le diabète et l'obésité (327). Les bactéries commensales (non pathogènes) sécrètent des métabolites qui jouent un rôle clé dans le métabolisme. Par exemple, les AG à chaîne courte régulent l'appétit, la signalisation de l'insuline et l'adipogenèse grâce aux récepteurs couplés à des protéines G situés sur les CEE, les neurones sympathiques et le tissu adipeux (327). Il n'est donc pas surprenant que le microbiote intestinal puisse diriger le stockage des lipides de l'hôte dans le tissu adipeux, ce qui conduit à l'obésité. De plus en plus de preuves suggèrent également que le fond génétique de l'hôte modifie le microbiote intestinal et que cela, à son tour, module le métabolisme de l'hôte (327). En effet, des études ont démontré qu'une mutation génétique peut grandement influencer, dans certain cas, le phénotype nutritionnel de l'hôte dépendant du microbiote (327). En outre, d'autres études ont montré que la composition de la flore intestinale peut affecter la durée de vie de l'hôte (327).

L'homéostasie métabolique est essentielle pour la vie, car les dérèglements métaboliques sont à l'origine de plusieurs maladies défailtantes. L'obésité, une condition pathologique caractérisée par une accumulation excessive de lipides corporels, est de loin la maladie métabolique la plus répandue qui touche des centaines de millions de personnes dans le monde. *jouvence* semble être une intervention idéale pour lutter contre les pandémies d'obésité. Étant donné que la perte de *jouvence* a entraîné une augmentation des dépôts de TG et l'obésité, et que sa restauration spécifiquement dans l'épithélium intestinal a sauvé les phénotypes mutants, nous concluons que le snoARN *jouvence* affecte le métabolisme des lipides principalement en dirigeant des modifications dans l'expression des gènes qui agissent pour maintenir l'homéostasie métabolique.

### **3.2. La déficience de *jouvence* perturbe le trafic du cholestérol.**

Dans la présente étude, nos résultats démontrent également un rôle inattendu du snoARN *jouvence* dans l'homéostasie du cholestérol d'une manière qui dépasse sa fonction canonique prédite. Les snoARN H/ACA sont connus pour cibler les ARNr, les ARNt et les snARN pour la pseudouridylation par la liaison de séquences cibles via leur poche de pseudouridylation. Nous montrons que la perte du snoARN *jouvence* a entraîné une réduction du niveau de cholestérol estérifié et une augmentation de la quantité de cholestérol libre (Fig. 42D, E et F). Malgré ces effets majeurs causés par la perte de *jouvence* sur l'homéostasie du

cholestérol, l'expression du snoARN *jouvence* seul dans le fond génétique mutant spécifiquement dans l'intestin n'a pas suffi pour sauver le phénotype du trafic de cholestérol (Fig. 43D, E et F). D'autres éléments sont probablement nécessaires pour corriger ce défaut. Récemment, des snoARN sont apparus comme des régulateurs de l'homéostasie du cholestérol. Par exemple, le snoARN à boîtes C/D U60 a été caractérisé pour cibler le trafic intracellulaire du cholestérol, où il semble moduler le trafic du cholestérol par le remodelage de la composition des phospholipides membranaires (241). Un snoARN à boîte H/ACA U17 a également montré être impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol (333).

Le cholestérol est un lipide cellulaire essentiel, qui est un régulateur de l'organisation et de la fluidité des membranes, et est un précurseur important de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des oxystérols et des acides biliaires. Après absorption, le cholestérol libre alimentaire peut être estérifié par les EC. Il est transporté de la membrane plasmique, où se trouve ~60% à 80% du cholestérol cellulaire total, vers le RE où il est converti en ester de cholestérol par l'enzyme ACAT (acyl-CoA cholestérol acyltransférase). Chez les mammifères, deux enzymes, l'ACAT1 et l'ACAT2, produits par deux gènes différents sont capables d'estérifier le cholestérol. La topologie des ACAT dans la membrane du RE indique que l'ACAT1 a son site actif du côté cytosolique, suggérant un rôle de cette enzyme dans la formation du cholestérol estérifié au sein de gouttelettes lipidiques cytosoliques de stockage. Au contraire, l'ACAT2 a son site actif à la face luminale du RE et serait donc à l'origine de la synthèse des esters de cholestérol sécrétés associés aux lipoprotéines (334). Une explication à la réduction du taux d'estérification du cholestérol pourrait être la réduction de l'expression ou de l'activité de l'ACAT. Cependant, le séquençage d'ARN n'a montré aucune perturbation dans l'activité de l'ACAT chez les mutants. Alors que des différences significatives entre les mutants et les WT en ce qui concerne la teneur en cholestérol (total, libre ou ester) ont été trouvées, nous pouvons également penser qu'une hydrolyse accrue des esters de cholestérol ou un accroissement de l'efflux de cholestérol pourrait contribuer à la réduction du taux d'estérification du cholestérol. En effet, le séquençage d'ARN a notamment révélé que l'expression de trois estérases,  $\alpha$ -*est1*,  $\alpha$ -*est2* et  $\alpha$ -*est5*, a été significativement augmentée chez les mutants, alors que l'expression d'une quatrième estérase,  $\alpha$ -*est7*, a plutôt été régulée à la baisse. De plus, le gène *l(2)03659* (*lethal(2)03659*) a vu son expression considérablement augmenter chez les mouches dépourvues de *jouvence*. *l(2)03659* fait partie de la famille des ABC transporteurs, dont certains interviennent dans l'efflux des stérols. Il est un orthologue du gène ABCC4 (ATP binding cassette subfamily C member 4). Le phénotype d'estérification observé chez les *F4* peut aussi s'expliquer par un défaut dans la voie impliquée dans l'internalisation du cholestérol dérivé des membranes plasmiques. De ce fait, nous supposons que le phénotype d'estérification du cholestérol résulte soit d'une réduction de l'apport de cholestérol de la membrane plasmique au RE, soit d'un trafic accru de cholestérol à partir des membranes du RE. Or lorsque nous avons voulu étudier la distribution des stérols dans l'intestin des mutants *jouvence* à l'aide d'un marquage à la filipine, qui colore les stérols non-estérifiés, nous avons constaté que ces mouches accumulent une grande quantité de cholestérol libre au niveau des membranes plasmiques des EC par rapport aux mouches témoins (Fig. 3C et D dans l'article du chapitre 3). Ces données suggèrent donc que la propension réduite du cholestérol à quitter

la membrane plasmique pour le RE peut être responsable de la réduction de l'estérfication du cholestérol. La perte de *jouvence* a ainsi pu rendre les cellules épithéliales de l'intestin défectueuses dans le trafic du cholestérol. Dans cette optique, la surexpression d'un gène homologue aux SR-BI des mammifères, *ninaD*, a été observée chez les mouches mutantes. Chez les mammifères, SR-BI est connu pour intervenir dans le transport et l'absorption du cholestérol (335) (336) (337) (338). Cette hypothèse sera abordée plus en détail dans un chapitre ultérieur. En outre, l'analyse transcriptomique a révélé que l'expression d'un orthologue de la drosophile des gènes de la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), *NPC2A*, qui jouent un rôle central dans le métabolisme du cholestérol, a été significativement affectée chez les mutants *jouvence*. Or, de nombreuses études ont montré que des mutations dans l'un des deux gènes humains de la maladie de NPC, *NPC1* et *NPC2*, provoquent une maladie neurodégénérative mortelle associée à une accumulation anormale de cholestérol dans les cellules. Ensemble, ces résultats suggèrent que les mutants *jouvence* puissent subir une neurodégénérescence.

En conclusion, le snoARN *jouvence* régule l'homéostasie du cholestérol en modulant l'expression d'ARNm cibles. De plus, ces résultats soulèvent la possibilité que le snoARN *jouvence*, en plus de ces cibles canoniques de pseudouridylation (ARNr 18S et 28S), puissent aussi moduler des cibles non conventionnelles. En effet, nous avons trouvé des ARNm qui sont régulés de manière différenciée par la perte de fonction du snoARN *jouvence*.



# **Chapitre 3 : Caractérisation du rôle de *ninaD* dans l'homéostasie du cholestérol.**

## **1. Introduction.**

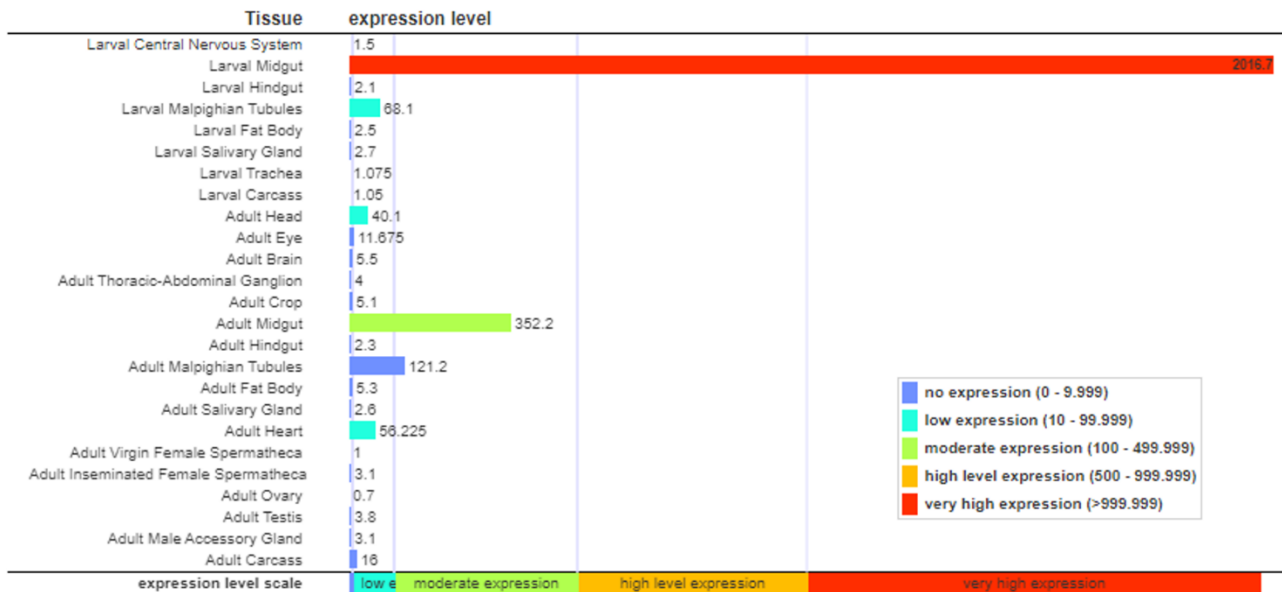
Environ 2% des gènes dérégulés chez les mouches mutantes ont subi une vérification complémentaire par qRT-PCR à partir d'un nouveau lot d'échantillons d'ARN. Cependant, au cours des investigations, notre attention s'est particulièrement portée sur le gène *ninaD* (*neither inactivation for afterpotential D*) parmi la liste des gènes dérégulés dans l'intestin. L'analyse transcriptomique a montré que le niveau d'ARNm du gène *ninaD* était considérablement élevé chez les mutants. En allant un peu plus loin dans notre étude, nous avons montré que l'expression ciblée de *jouvence* dans l'intestin a permis de restaurer le niveau d'ARNm du gène. Encore plus surprenant, le rétablissement du niveau d'expression de *ninaD* spécifiquement dans l'intestin avec l'utilisation d'un ARNi est suffisant pour restaurer, voire même prolonger, la durée de vie des mouches mutantes (313).

D'après la littérature, le gène *ninaD* code pour des protéines membranaires homologues aux récepteurs Scavenger de classe B de type I (SR-BI) chez les mammifères, des récepteurs de surface cellulaire qui se lient aux particules de lipoprotéines de haute densité (HDL) (335). En effet, la comparaison avec le SR-BI humain révèle une identité de séquence de 24%. Les récepteurs Scavenger de classe B sont composés de deux domaines transmembranaires aux extrémités intracellulaires N- et C-terminale, séparés par une grande bouche extracellulaire (339). Des études ont montré que ce domaine extracellulaire permet la détection des stérols et joue un rôle essentiel dans l'absorption sélective et le trafic intracellulaire du cholestérol. Chez les mammifères, le SR-BI est principalement décrit dans le foie et les tissus stéroïdogènes (335). Cette protéine transmembranaire s'est avérée être impliquée dans plusieurs aspects du métabolisme des lipides, tels que le transport du cholestérol. En effet, le SR-BI assure l'absorption cellulaire de l'ester de cholestérol des HDL de manière sélective (335). Il se lie aux HDL circulantes via leurs composants apolipoprotéiques et forme un canal hydrophobe le long duquel migrent les esters de cholestérol facilitant ainsi le transfert de l'ester de cholestérol des HDL vers les cellules cibles. En outre, il a été montré que le SR-BI peut également diriger le flux bidirectionnel du cholestérol non-estérifié entre les lipoprotéines (LDL et HDL) et les cellules. Ainsi, le SR-BI contribue à fournir aux tissus cibles des esters de cholestérol mais aussi à éliminer l'excès de cholestérol des tissus périphériques et à le transporter vers le foie, un processus appelé transport inverse du cholestérol. De plus, des études récentes ont fourni des preuves d'un rôle supplémentaire du SR-BI dans les cellules épithéliales absorbantes de l'intestin (EC), où ce récepteur assure l'absorption du cholestérol alimentaire et d'autres classes de lipides, telles que les TG et les phospholipides (336) (337).

A ce jour, quatorze homologues de SR-BI ont été identifiés chez la drosophile, dont *ninaD*. Initialement,

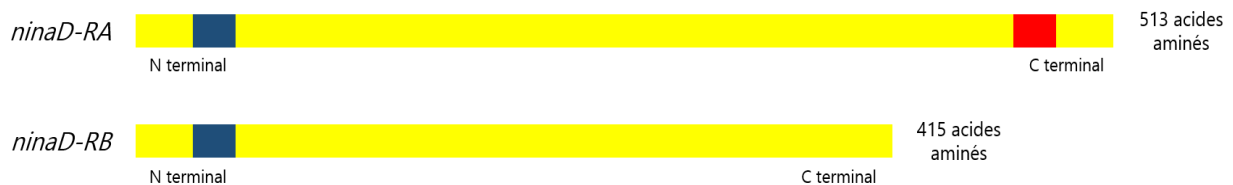
*ninaD* a été décrit dans un criblage des gènes affectant la vision chez la drosophile, et plus particulièrement dans une étude basée sur des électrorétinogrammes, d'où son nom « *neither inactivation for afterpotential D* ». En effet, de nombreuses études ont montré qu'une mutation dans le gène *ninaD* entraîne une réduction significative de la teneur en rhodopsine dans les photorécepteurs en limitant notamment la quantité de rétinoïdes disponibles pour la formation du chromophore de la rhodopsine, ainsi que des électrorétinogrammes altérés (340). Par la suite, d'autres preuves ont révélé que *ninaD* a des fonctions dans l'absorption intestinale des caroténoïdes et dans la biosynthèse de la rhodopsine. Des mutations dans le gène *ninaD* entraînent effectivement des défauts à ce niveau (341) (342). Des travaux récents ont montré que *ninaD* est fortement exprimé dans l'intestin moyen des larves (Fig. 44). Les résultats suggèrent que, tout au long du développement, le récepteur Scavenger *ninaD* agit dans l'absorption et le stockage des caroténoïdes pendant les stades larvaires (343). Chez la mouche adulte, *ninaD* est toujours exprimé dans l'intestin moyen, à un niveau plus faible que chez les larves, mais aussi dans le système nerveux central et dans les lobes optiques, où il semble aussi être requis dans l'absorption des caroténoïdes dans ces tissus (Fig. 44) (343). Cependant, l'expression intestinale de *ninaD* pourrait suggérer une fonction possible dans l'homéostasie lipidique et énergétique de l'organisme (344). De plus, deux variantes d'épissage sont exprimées à partir du gène *ninaD* chez la drosophile, appelées *ninaD-RA* et *ninaD-RB* (343). Les prédictions structurelles ont révélé que *ninaD-RA* possède deux domaines transmembranaires près de ses extrémités N- et C-terminales, tandis que *ninaD-RB* n'a pas la région C-terminale de *ninaD-RA*, donc la région transmembranaire (Fig. 45) (343). La combinaison de ces études suggère que *ninaD* peut fonctionner dans le métabolisme du cholestérol.

Dans l'étude présentée ici, en plus de mieux cerner le rôle de *jouvence* dans l'épithélium de l'intestin et mieux comprendre ce dysfonctionnement intestinal chez les mutants, des expérimentations sont mises en œuvre afin de caractériser davantage la fonction de l'homologue du SR-BI de la mouche, *ninaD*, dans l'homéostasie du cholestérol.



**Figure 44 – Profil d’expression du gène *ninaD* aux stades larvaires et adultes dans divers tissus.**

*ninaD* est principalement exprimé dans l'intestin moyen, surtout au cours du développement, mais aussi dans d'autres tissus, tels que les tubules de Malpighi, la tête et le cœur. Source : Prise de <https://flybase.org/>.



**Figure 45 - Structures primaires des deux isoformes de la protéine *ninaD*.**

Les positions des domaines transmembranaires N-terminal et C-terminal sont indiquées en **bleu** et en **rouge**, respectivement. *ninaD-RA* et *ninaD-RB* contiennent un domaine transmembranaire de ~21 AA qui est situé à ~15 AA de l'extrémité N-terminale. *ninaD-RA* contient en plus un domaine transmembranaire comprenant ~20 AA qui est situé à ~36 résidus de l'extrémité C-terminale. Ainsi, *ninaD-RA* contient un domaine extracellulaire putatif comprenant ~421 résidus. Source : Adaptée de (343).

## 2. Résultats.

### 2.1. Résultats prochainement soumis.

Sur les listes de gènes établies par le séquençage d'ARN, on a retenu une attention particulière, le gène *ninaD* classé 7<sup>ème</sup> sur les 314 gènes surexprimés (4,75 fois plus haut que les contrôles). Étant donné que l'homéostasie du cholestérol est fortement dérégulée causée par la mutation de *jouvence*, il nous a semblé pertinent d'étudier plus en détail ce gène. Comme mentionné plus haut, le gène *ninaD* code un récepteur Scavenger avec une identité de séquence significative aux récepteurs Scavenger de classe B des mammifères,

SR-BI et CD36. Ces récepteurs Scavenger de classe B des mammifères médient l'absorption de lipides, tels que les AG à longue chaîne et les stérols des lipoprotéines. Par conséquent, nous nous sommes demandé, en plus de la longévité (313), si la diminution du niveau d'expression intestinal de *ninaD* dans le fond génétique mutant avec le transgène *UAS-RNAi-ninaD* pourrait sauver le métabolisme lipidique du phénotype mutant. Sur la base des résultats présentés ici, nous avons mis en évidence un nouveau rôle de *ninaD* chez la drosophile dans l'absorption/métabolisme du cholestérol. Ces travaux ont fait office d'un report et qui sera bientôt soumis dans le journal *Current Biology*.

# ***ninaD* regulates cholesterol homeostasis from the midgut which protects against neurodegeneration.**

Stéphanie Soulé<sup>1</sup>, Lucille Mellottée<sup>1</sup>, and Jean-René Martin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR-9197, CNRS/Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

\*Correspondence: [jean-rene.martin@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:jean-rene.martin@inaf.cnrs-gif.fr)

## **SUMMARY**

Cholesterol homeostasis is required to maintain normal cellular function. Recently, we have reported the genetic and molecular characterization of a small nucleolar RNA (*jouvence*) required in the enterocytes, the main epithelial cells of the gut (1). The loss of *jouvence* shortens lifespan and leads to a pronounced intestinal hyperplasia, which leads to defects in metabolic parameters (2) (3). Inversely, targeted expression of *jouvence* in enterocytes (over-expression) increases lifespan, and prevents hyperplasia in aged flies gut (1). A transcriptomic analysis of *jouvence* deleted adults gut revealed a deregulation in expression level of several genes. Among them, *ninaD* (*neither inactivation nor afterpotential D*), which encodes a mammalian homolog to class B Scavenger receptor-like membrane protein (4), is importantly upregulated. In *Drosophila*, *ninaD* is known to be required for the uptake and storage of the dietary carotenoid and consequently for the formation of rhodopsin (4–7). The targeted expression of a *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the gut restores the mRNA level of *ninaD* and consequently result in lifespan extension (1). Here, we demonstrate that *ninaD*, required in the gut epithelium, is essential for cholesterol homeostasis. *jouvence*-deleted flies accumulate an excess of free cholesterol and triglycerides, but a striking decrease of cholesterol-ester. In addition, at the organismal level, *jouvence*-deleted old flies present neurodegenerative lesions. Restoring *ninaD* mRNA level in the gut with a targeted *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* extends lifespan, restore metabolic homeostasis and prevents neurodegeneration. Our studies identifies a new aspect of *ninaD* as a central regulator of cholesterol homeostasis as well as a longevity-promoting factor.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Downregulation of *ninaD* in the gut rescues lifespan in *jouvence*-deleted flies.

We have previously reported that loss of *jouvence* function shortens lifespan (1), a phenotype that has been related to the deregulation of several genes. Interestingly, this phenotype is rescued by specifically restoring the mRNA level of *ninaD* in the epithelium of the gut and more precisely in enterocytes (EC). Indeed, the adult conditional targeted expression of a *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* transgene (*Mex-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*) in EC, the site of *jouvence* expression, rescues the lifespan of *jouvence* deletion. To consolidate the role of *ninaD* in regulating lifespan, we employed few other GAL4 drivers with gut-specific expression pattern to express the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*. In *jouvence*-deleted flies, the EC-specific driver *MYO1A-GAL4*, used to downregulate *ninaD* mRNA level, leads to lifespan extension by about 50% (Fig. 1A and Tabl. S2). Similarly, using the *CG8997-GS* driver line also expressed in the epithelium of the gut, allowing the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* only in adulthood after feeding with RU486, also resulted in lifespan extension of 88% (Fig. 1B and Tabl. S2). These results confirm that the downregulation of *ninaD* mRNA level in the EC is sufficient for lifespan extension effects in *Drosophila jouvence* mutants, and even when it is expressed only in adulthood.

To investigate further the role of *ninaD* in the whole *Drosophila* fly, as well as in the gut, we used *ninaD<sup>1</sup>* mutant (previously described as *ninaD<sup>P245</sup>*), which map to the genomic position 36E-F on chromosome 2. The *ninaD<sup>1</sup>* mutant allele is a base pair exchange (G to A), resulting in a stop codon at position 71 (4). In *Drosophila*, mutation in the *ninaD* gene results in a carotenoid-free and consequently in vitamin A-deficient phenotype (4–7). We also determined the lifespan of *ninaD<sup>1</sup>* homozygotes and *Del,ninaD<sup>1</sup>* double-homozygous mutants. Indeed, we generated a *Del,ninaD<sup>1</sup>* double-mutant to determine whether the longevity effect in *ninaD<sup>1</sup>* mutants is prevented or enhanced by *jouvence*, in other words to establish an epistasis relationship between these two genes. We found that the double-homozygous mutants (*Del,ninaD<sup>1</sup>*) had a significantly longer lifespan than the *ninaD<sup>1</sup>* flies (Fig. 1C and Tabl. S2).

To confirm the RNAi knockdown efficacy, we measured by qRT-PCR the mRNA level of *ninaD* on dissected guts in the different genotypes. Specific expression of *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* in EC of *jouvence*-deleted flies (which is importantly increased) (1) is sufficient to restore (decrease to a roughly normal level) the mRNA level of *ninaD*, both with the *MYO1A-GAL4* driver (Fig. 1D), as well as when it is expressed only in adulthood with the *CG8997-GS* driver (Fig. 1E). Moreover, qRT-PCR analysis showed that the mRNA levels of the *ninaD* gene were hardly detectable in homozygous *ninaD<sup>1</sup>* mutant flies (Fig. 1F). This decrease is probably caused by a rapid degradation of the mRNA of the *ninaD<sup>1</sup>* allele due to its nonsense mutation,

as formerly hypothesized (4), as well as in a more general way for other mutated genes (8). On the other hand, surprisingly, expression level of mRNA of *ninaD* in the double-homozygous mutants remains as high as in the *jouvence*-deleted flies (Fig. 1F), suggesting that the putative degradation phenomena does not occur in *jouvence*-deleted flies. This result could suggest that the pseudouridylation of the ribosomal RNA by *jouvence*, as previously demonstrated (1), or putatively of mRNA (9) could prevent the degradation of the mutated *ninaD*<sup>1</sup> mRNA.

### ***ninaD* is expressed in R4 and R5 segments of the adult midgut.**

To address the potential role and requirement of *ninaD*, the expression pattern of *ninaD* was determined more precisely in adult tissues. A high throughput analysis (FlyAtlas Anatomical Expression Data, Microarray, *FlyBase*) has reported a weak mRNA expression of *ninaD* in various tissues in adult flies as for instance the eye, brain, and fat body, a low expression in the Malpighian tubules, head, and heart, and a moderate expression in the midgut. Nevertheless, its precise localization in this last tissue remain to be precisely determined. Unfortunately, since no antibodies against the *ninaD* protein exists, we carried out our histological analysis using the *ninaD*-*GAL4* transgenic flies construct (10) to express the *UAS-nls-GFP* transgene. *ninaD* is faintly detected in some adult tissues, as the pericerebral fat body and retina (Fig. 1G), while it is well detected in the midgut. Higher magnification revealed that the expression in this last tissue corresponds to two distinct areas, the R4 and R5 regions (Fig. 1H).

### ***ninaD* is required in the midgut for sterol homeostasis.**

*ninaD* encodes a *Drosophila* class B Scavenger receptor-like membrane protein homologous to those of mammalian, SR-BI and CD36 (4). In mammals, this receptor plays critical roles in cholesterol metabolism, mainly in the form of High-Density Lipoprotein cholesteryl ester (HDL-CE) (11). SR-BI also mediates the bidirectional flux of unesterified cholesterol between target cells and the circulating lipoproteins (HDL and LDL) (12–14). In *Drosophila*, it has been reported that *ninaD* is essential for the cellular uptake of dietary carotenoids for the formation of the visual chromophore (4). However, a direct involvement of class B Scavenger receptors in insect cholesterol and others lipid metabolism has not yet been reported. As *ninaD* is highly expressed in the R4 and R5 regions of the midgut and to determine whether *jouvence* mutants (in which *ninaD* is importantly upregulated) display defects in lipid

homeostasis, we measured the cholesterol and triglycerides (TG) levels in controls and *jouvence*-deleted flies in 7-days-old adult flies. *jouvence*-deleted flies have total cholesterol levels reduced by 14% (Fig. 2A) with in particular a higher level of free cholesterol (Fig. 2B), but a striking decrease in the amount of cholesterol ester (Fig. 2C). Moreover, *jouvence*-deleted flies display significantly a higher level of TG (56%) than the controls (Fig. 2D). To further pinpoint the role of *ninaD* in lipid metabolism, we assess whether the *ninaD*<sup>1</sup> mutation also interfere with cholesterol and TG levels, by quantifying these two physiological metabolic parameters on *ninaD*<sup>1</sup> flies. The amount of cholesterol ester is importantly increased compared to control flies (Fig. 2C), while the level of free cholesterol is decreased (Fig. 2B), with a total cholesterol remaining unchanged (Fig. 2A). Moreover, in *ninaD*<sup>1</sup> flies, the total amount of TG is increased compared to control flies (Fig. 2D). Finally despite a high level of expression of a mutated form of *ninaD*<sup>1</sup> protein in the midgut, the overall level of the different forms of cholesterol were not different in *Del,ninaD*<sup>1</sup> double-mutants compared to *ninaD*<sup>1</sup> flies (Fig. 2A, B and C). Whereas the level of TG is increased in *Del,ninaD*<sup>1</sup> double-mutants compared to *ninaD*<sup>1</sup> flies, as well as to control flies (Fig. 2D). These results provide evidence that *ninaD* is involved in the cholesterol homeostasis, and to a less extent, to lipids metabolism. At first glance, these results seem to be in contradiction to a former reported study, in which they concluded that *ninaD*<sup>1</sup> homozygous adults have highly reduced carotenoid levels compared with wild-type (WT) flies, but have otherwise normal lipid contents (4), leading to suggest that *ninaD* was not involved in lipids metabolism. However, this previous study was evaluating the qualitative composition of fatty acids rather than the overall amount of TG. Moreover, this former study didn't explore the level neither the different forms of cholesterol.

In a step further, since *ninaD* expression has been faintly detected in other tissues in adult flies, and especially in the fat body (Fig. 1G and Flybase), we wonder if the expression of *ninaD* in this tissue is required and if its disruption could lead to lipids and/or cholesterol levels defects. We then perform a RNAi-mediated knockdown experiments using various fat body and gut-specific drivers to express the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup>. In *jouvence*-deleted flies, restoring the *ninaD* mRNA level, by RNAi knock-down only in EC using *MYO1A-GAL4* restored the cholesterol ester levels equivalent to those of WT flies (Fig. 2G). However, the level of free cholesterol remains unchanged (Fig. 2F), while the total cholesterol is increased (Fig. 2E). In addition, the total TG are decreased (rescued) in these flies (Fig. 2H). These results suggest a new function of the *ninaD* scavenger receptor in cholesterol metabolism. However, since *ninaD* has also been reported to be importantly expressed during the development and especially in the larval midgut (FlyAtlas Anatomical Expression Data Microarray, FlyBase), we wonder if restoring the mRNA level of *ninaD* in the epithelium of the gut, and so, only in adulthood is sufficient to restore the lipids and cholesterol defects observed in *jouvence* deleted flies. We used the *Mex-GS* driver line (1) to control the temporal expression of the



*UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* only in adulthood (*Del,Mex-GS>ninaD<sup>RNAi</sup>*), and thus quantified the levels of these compounds in adult. Again here, the different metabolic parameters (cholesterol and TG) were rescued compared to control flies (Fig. 2E, F, G and H). Similar results were obtained with the *S<sub>1</sub>106-GS* driver line, although this line isn't expressed only in the epithelium of the midgut, but also in the fat body (Figure 2E, F, G and H). To conclude, in *jouvence*-deleted flies, in which the *ninaD* expression is importantly upregulated, the cholesterol defects can be rescued by the targeted expression of *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* in the epithelium of the midgut, allowing to rescue (decrease) the mRNA level of *ninaD*, indicating that these metabolic defects arises from a specific deregulation of *ninaD* function in this tissue.

### **Restricting *ninaD* expression in fat body is dispensable for lipid metabolism and viability.**

Since it has been reported that *ninaD* is also moderately expressed in adult head and weakly in adult fat body (Fig. 1G and FlyBase), we wonder if *ninaD* functions in this tissue is required for maintaining proper metabolic homeostasis. To test this hypothesis, we temptingly rescue in *jouvence*-deleted flies, the *ninaD* mRNA level by expressing the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* in the fat body. Normal cholesterol and TG levels weren't restored in *jouvence*-deleted flies upon expression of *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* exclusively in the fat body with *Lsp2-GAL4* or *Cg-GAL4* drivers (Fig. 2I, J, K and L). Since the *Lsp2-GAL4* driver line is also known to be expressed at different developmental stages, we use a conditional adult-specific expression line, the *Lsp2-GS* (15), to restrict the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* into the fat body only in adulthood. As for the *Lsp2-GAL4*, the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* did not rescue the *jouvence* phenotypes, since cholesterol and TG levels weren't restored compared to the non-induced flies (Fig. 2I, J, K and L). In complement, we also assessed the adult lifespan of these different fat body GAL4 driver lines. Surprisingly, targeted knockdown of mRNA level of *ninaD* in the fat body shortens lifespan, both for *Del,Lsp2-GAL4* (Fig. 2M and Tabl. S2), as well as for *Del,Cg-GAL4* (Fig. 2N and Tabl. S2). However, the expression of *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* only in adulthood, by the *Lsp2-GS* line did not affect the lifespan (Fig. 2O and Tabl. S2), suggesting that the deleterious effect of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* expression might result from its expression through developmental stages. Finally, the targeted expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* both into the epithelium of the gut and the fat body, and so, only in adulthood (*Del,S<sub>1</sub>106-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*) increases lifespan (Fig. 2P and Tabl. S2), indicating that the rescue of a homeostatic *ninaD* mRNA level is required in the gut. In brief, these results indicate that the essential functions of *ninaD* reside in the midgut for maintaining the cholesterol homeostasis.

## Loss of *jouvence* function increases gut cholesterol and lipids.

The homology of *ninaD* to SR-BI suggests that these proteins may have conserved biochemical function (16–18). Nonetheless, many important questions concerning the precise function of *ninaD* remain unanswered. Some studies have already pointed out the role of various genes in the cholesterol homeostasis in the gut, as *NPC1 & 2* (19–21), *magro*, a secreted Lipase A (22) or DHR96, a nuclear receptor that regulates the cholesterol homeostasis (23). In this context, it remains unclear whether *ninaD* specifically promotes the absorption of sterols or whether this protein participates in the intracellular trafficking of cholesterol in the intestinal epithelium. As a first step, we further determine, at the cellular level, the precise localization of *ninaD* in the EC. Since unfortunately, no antibody exists against *ninaD*, we target a UAS-driven *ninaD* transgene coupled to EGFP (*UAS-ninaD-EGFP*) (24) to the midgut using two independent intestinal driver lines, *Mex-GAL4* and *MYO1A-GAL4*. The similar results obtained with both driver lines revealed that the *ninaD-EGFP* fusion protein is specifically expressed in the plasma membrane of EC (Fig. 3A and B). Based on our observations that upregulation of *ninaD* in *jouvence*-deleted flies affects the sterol metabolism, we next examined the sterols distribution in the midgut using filipin staining (20). Filipin is a fluorescent polyene macrolide that binds 3- $\beta$ -hydroxysterols such as free cholesterol. Unesterified (free) cholesterol in the plasma membrane of EC is increased in *jouvence*-deleted flies relative to WT controls (Fig. 3C and D), an expected result since in *jou*-deleted flies, the upregulated *ninaD* is a WT allele. By contrast, *ninaD*<sup>1</sup> mutants midgut appeared to be nearly devoid of filipin staining (Fig. 3E), whereas surprisingly in *jouvence*-deleted flies (*Del,ninaD*<sup>1</sup> double-mutant), the distribution of sterols shows an intermediate staining between the *ninaD*<sup>1</sup> and the *jouvence*-deleted flies midgut (Fig. 3F)

In addition, to evaluate qualitatively the lipid content in the midgut, Oil-Red-O (ORO) stainings were conducted. More and larger lipids droplets were found in the midgut of *jouvence*-deleted flies compared to controls (Fig. 3G-H). These qualitative data correlate with the quantifications of physiologic parameters (Fig. 2D), in which we observed more TG in *jouvence*-deleted flies. However, the *ninaD*<sup>1</sup> mutant flies present a similar lipid profile than WT controls (Fig. 3H), while the *Del,ninaD*<sup>1</sup> double-mutants display a dramatic increase in lipid content such as *jouvence*-deleted flies (Fig. 3I). However, these last results do not perfectly fit with the quantified total TG displayed in Figure 2B, and more particularly for the *ninaD*<sup>1</sup> mutant. This discrepancy could come from the fact that the TG determinations have been performed on the whole flies, while the ORO staining, performed directly on dissected gut, allow to evaluate only the lipid contents on this last tissue. In brief, the filipin staining associated to the cholesterol quantification indicates that *ninaD* is required in the cholesterol metabolism, while

the ORO staining related to the TG level rather argues that *ninaD* is not directly involved in the TG perturbation.

### **Deregulation of *ninaD* leads to neurodegenerative lesions in old flies.**

In *Drosophila*, impairment in cholesterol homeostasis has already been associated with various neurodegenerative disorders, as for instance, in the Niemann-Pick disease (19–21), as well as in *löchrig* mutant, which interferes with the cholesterol homeostasis (25). In human, altered cholesterol metabolism and hypercholesterolemia significantly contribute to neuronal damage and progression of Alzheimer diseases (26, 27). These previous reports suggest that the nervous system is highly sensitive to alterations in lipid and cholesterol homeostasis. This sensitivity is thought to result from the high metabolic demand of neurons and their supporting cells. In this context, and since neurodegeneration is predicted to be age progressive, we examined the brain of our different studied genotypes in order to assess, in old flies (40-days-old), neurodegeneration as manifested by the appearance of vacuolar lesions. At 5-days-old, WT controls display an intact central brain with no detectable evidence of vacuolization (data not presented). However, at 40-days-old, WT flies show clear signs of neurodegeneration, with the appearance of several vacuoles of different sizes (Fig. 4A). In 40-days-old *jouvence*-deleted flies, vacuolization is more severe in the central brain (Fig. 4B), which is more pronounced in frequency and size than age-matched WT controls (Fig. 4K and L). Indeed, the quantification of the number of vacuoles (Fig. 4K), as well as the surface area of the lesions (Fig. 4L), in *jouvence*-deleted flies is significantly higher than in controls. Similarly, at 40-days-old, *ninaD*<sup>1</sup> and *Del,ninaD*<sup>1</sup> flies show an increase in vacuolization relative to age-matched WT controls (Fig. 4C, D, K and L).

In a step further, since we have demonstrated that *ninaD* is required for sterol metabolism from the midgut epithelium, we wonder if the downregulation of *ninaD* in the midgut might rescue the age-dependent brain deterioration by restoring cholesterol levels. *jouvence*-deleted flies expressing the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> driven by *MYO1A-GAL4* in the midgut rescue the neurodegenerative lesions (Fig. 4E and F), as well as the number of vacuoles and the affected area of the brain (Fig. 4K and L). Even more precisely, the targeted expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> in the midgut, but restricted only in adulthood, and so by two independent driver lines, *Mex-GS* (Fig. 4G and H) and *CG8997-GS* (Fig. 4I and J), rescue the neurodegenerative lesions in old flies (Fig. 4K and L). Taken together, these results indicate that restoring the mRNA level of *ninaD* in the midgut was sufficient to mitigate the mutant effects, and serves as a neuroprotective role.

## Decreasing the endogenous mRNA level of *ninaD* in WT flies increases lifespan.

Since the increase level of *ninaD* mRNA in *jouvence*-deleted flies decreases lifespan, which was associated to an importantly increases of the level of cholesterol ester, we wonder if the decrease of the physiological *ninaD* mRNA level in WT flies could modify the lifespan as well as the metabolic parameters. Then, we specifically target the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* in the epithelium of the gut using three independent GAL4 driver lines. First, in *MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* flies, the lifespan is increased (Fig. 5A). In addition, the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* only in adulthood, using two independent Gene-Switch (GS) lines (*Mex-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* and *CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*), also leads to an increase of lifespan (Fig. 5B and C), indicating that this positive effect, meaning decreasing the physiological level of the *ninaD* mRNA, is sufficient to increase lifespan when it occurs only in adulthood. Moreover, a qRT-PCR performed on *MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* confirms that the mRNA level of *ninaD* is decreased compared to control flies (Fig. 5D), demonstrating the efficacy of the RNAi. In parallel, the quantification of the metabolic parameters indicate only a slight modification in total cholesterol due to a decrease of cholesterol ester, while the TG remains unchanged (Fig. 5E, F, G and H).

## CONCLUSION

Taken altogether, our results indicate a new role for *ninaD* in control of cholesterol homeostasis in the EC, suggesting that *ninaD* shares significant functional characteristics with its mammalian homologous SR-BI. Since both *ninaD* null mutant (*ninaD<sup>1</sup>*) and *jouvence*-deleted flies, in which a WT form of *ninaD* is highly upregulated, lead to a modification on cholesterol ester but not in the total cholesterol, these results suggest that a very precise level of *ninaD* is required to regulate the balance between the free cholesterol and cholesterol ester. In other word, *ninaD* seems to be rather involved in the de-esterification process of cholesterol, instead of in its absorption. Further experiments will be required to determine precisely the molecular mechanism by which *ninaD* regulates the different forms of cholesterol. Finally, restoring the level of cholesterol and particularly of cholesterol ester is sufficient to rescue the neurodegenerative lesions, suggesting that the cholesterol ester plays a neuroprotective role, an effect already raised in several human neurodegenerative diseases, as Alzheimer disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Fruit fly lines.

*Drosophila melanogaster* flies were grown on standard medium (1.04% agar, 8% cornmeal, 8% brewer yeast and 2% nipagin as a mold inhibitor) at 25°C, 12:12 light:dark cycle in a humidity-controlled incubator. For ageing experiments, to avoid larval growth and overpopulation in vials, 25 adult flies per vial were transferred to new food vials every 2 or 3 days. *Canton-S* (CS) flies were used as control. The results described in this present study were obtained from the females. All genotypes were outcrossed to the WT CS (cantonization) at least 6 times to thoroughly homogenize the genetic background. RU486 (Mifepristone) (*Sigma-Aldrich*, Cat. #M8046) to induce the Gene-Switch activity was dissolved in ethanol and mixed into the media when preparing food vials. RU486 doses used were 25 µg.mL<sup>-1</sup> final concentration. *S<sub>1</sub>106-GS* (FlyBase ID: FBti0153270), *Canton-S* (FlyBase ID: FBst0064349) and *P{ninaD-GAL4.W}3* (FlyBase ID: FBti0078084) were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* line (NIG.31783R) was acquired from Fly Stocks of National Institute of Genetics (NIG-Fly, Japan, <https://shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/>). *MYO1A-GAL4* was kindly provided by B.A. EDGAR (Heidelberg, Germany); *Mex-GAL4* from G.H. THOMAS (Pennsylvania, UAS); *CG8997-GS* was from H. TRICOIRE (Paris, France); *ninaD<sup>1</sup>* mutant from D. VASILIAUSKAS (Gif-sur-Yvette, France); *P{UAS-ninaD-EGFP}* from R. BENTON (Lausanne, Switzerland), and *UAS-nls-GFP(4776)* from F. ROUYER (Gif-sur-Yvette, France). These transgenic lines were then introduced into the *jouvence* deletion background (*Del*) by standard genetic crosses. *Mex-GS* driver line have been generated in the laboratory (1), and *Del,ninaD<sup>1</sup>* double-mutant has been generated by recombination since they are located both on the second chromosome. In brief, a cross between the *jouvence*-deleted flies and the *ninaD<sup>1</sup>* null mutant has been performed. Subsequent progeny were analyzed by PCR on the genomic DNA, followed by sequencing the PCR products to search for the presence of the nonsense mutation of *ninaD<sup>1</sup>* mutant (genotyping).

### Lifespan analysis.

Following amplification, flies were harvested every day after hatching. Female flies were maintained with males in fresh food vials for 4 days at a density of 30 individuals per vial. On day 4, females were separated from males, and placed in a cage (about 200 to 300 females per cage). Cages (100 mm high and 60 mm diameter = 283 cm<sup>3</sup>) used for lifespan experiments

are made in plexiglass. The top is covered by a mesh allowing a perfect aeration, while the bottom (floor) is closed by a petri dish containing the food medium. The aging animals were transferred to fresh food every two days and the number of dead flies was scored. The lifespan plots were generated by calculating the percentage of survivorship every two days and plotting viability as a function of time (days) using log-rank test (28).

### **Quantitative RT-PCR.**

RNAi knock-down efficiency was measured on dissected midguts or whole flies from 5 to 7-days-old female flies. 30-40 midguts per sample were immediately frozen in nitrogen liquid and kept at -80°C. Each genotype was collected in triplicate. Total RNA from collected midguts were extracted using SV Total RNA Isolation System kit (*Promega*, Cat. #Z3100) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured using a spectrophotometer (*BioRad*) and purity of the samples was estimated by OD ratios ( $A_{260}/A_{280}$  ranging within 1.8 – 2.2). Total RNA were then analyzed on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide to verify any DNA contamination. All the samples were processed for 35 PCR cycles (95°C for 45 s ; 55 - 60°C for 30 s ; 72°C for 30 s), with a final extension step at 72°C for 10 min. cDNA were transcribed from 1 µg DNA-free total RNA using the M-MLV reversible transcriptase (*Invitrogen*, Cat. #28025-013) and oligo(dT) primer (*Promega*, Cat. #C1101). Quantitative RT-PCR was performed on a Bio-Rad CFX96 instrument (*BioRad*) using LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (*Roche*, Cat. #03752186001). All assays were done in triplicate. Data were then analyzed according to the  $\Delta\Delta C_t$  method, and normalized to  $\alpha$ -*Tub84B* levels. Primers used are summarized in the Supplemental Experimental Procedures (see Supplementary Table S1).

### **Brain histology.**

Flies were filed in collars and fixed for 4h in fresh Carnoy's fixative (ethanol:chloroform:acetic acid at 30:15:5) (29). Heads were then embedded into paraffin for sectioning using standard histological procedures. Sections of 7 µm were stained with 1% Toluidine blue (*Sigma-Aldrich*, Cat. #89640-5G), and 1% Borax for 8 min. Samples were mounted with Mowiol, and photographed on a Leica DM600B light microscope (*Leica*, Germany) equipped with a Hamamatsu C10600 ORCA-R<sup>2</sup> digital camera. Quantification of the neurodegenerative lesions was performed on half of the brains using ImageJ software. Briefly, images have been converted to 32 bits and a minimum threshold have applied to the entire image. The area above the threshold, whose correspond to the vacuoles (neurodegenerative

lesions), were then labeled and quantified in the brain to estimate their number and size. Data are expressed as number of vacuolar lesions per  $\mu\text{m}^2$  of measured surface.

## **Lipid staining.**

### *Filipin cholesterol staining.*

Midguts from female flies at 7 day-old were fixed in 4% PFA for 30 min, and rinsed twice in 1X PBS + 0.05% Tween 20 (PBST). A fresh 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  stock solution of filipin (*Sigma-Aldrich*, Cat. #F4767-1MG) in 100% ethanol was used. Samples were stained in the dark with 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  filipin diluted in PBST solution for 30 min, washed with PBST, and mounted in Mowiol. Stained tissues were immediately visualized with a Leica DM 600B light microscope (Leica, Germany), and imaged with a Hamamatsu C10600 ORCA-R<sup>2</sup> digital camera, using an excitatory wavelength of 360 - 480 nm.

### *In situ Oil-Red-O (ORO) staining.*

Midguts from 7-days-old adult female flies were fixed in 4% PFA for 30 min. After fixation, samples were rinsed with PBST and permeabilized in a 50%/50% PBST/isopropanol solution for 2 min. A stock solution of 0.1% ORO (*Sigma-Aldrich*, Cat. #O1391) in isopropanol was used. Tissues were incubated for 30 min in 0,05% ORO solution, then placed in a mixture of 50% isopropanol in PBST for 2 min. Samples were rinsed twice with PBST, and mounted with Mowiol. Images were acquired with a Leica DM 600B light microscope (*Leica*, Germany) and photographed with a Hamamatsu C10600 ORCA-R<sup>2</sup> digital camera.

## **Metabolic parameters.**

Metabolic analyzes were carried out on 24 single 7-days-old adult female flies. Flies were weighed, and rinsed twice with PBS to remove all remaining food and dirt on their cuticule.

### *Cholesterol measurement.*

Cholesterol in flies were measured as described in (30) with some slight modifications. In brief, animals were homogenized in a Potter apparatus with a 7:11:0.1 chloroform/isopropanol/NONIDET P40 solution using a hand homogenizer. After a 10 min spin at 13,000g the supernatant was dried in a Speed Vacuum Concentrator for 2h at 50°C. The

lyophilized material was then dissolved in 1X reaction buffer and split into two samples. 0.5 µL cholesterol esterase was added to one sample and both samples were incubated at 37°C overnight. Free cholesterol and cholesterol ester levels were measured using the Amplex Red cholesterol assay kit (*Invitrogen*, Cat. #A12216), according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was read using a Tecan™ GENios® plate reader (*TECAN*) with a 530/590 nm filter set and compared to a standardization curve.

#### *Triglyceride assay.*

Flies (without the head) were homogenized in PBST using a hand homogenizer. To avoid any enzymatic conversion of TG, all proteins were inactivated by heating the homogenate at 70°C for 10 min. The supernatant was assayed using LiquiColor® Triglycerides kit (*STANBIO*, Cat. #2200-430) according to the manufacturer's protocols. Absorbance was measured at 492 nm with a Tecan™ GENios® plate reader (*TECAN*), and compared to a standardization curve.

#### **Analysis of expression pattern of *ninaD*.**

All histological experiments were carried out on dissected guts and cryosections of whole flies from adult females aged of 7 days. To determine the expression pattern of *ninaD* (*ninaD-GAL4>UAS-nls-GFP*, and *Mex-GAL4 >UAS-ninaD<sup>EGFP</sup>*), samples were fixed in 4% PFA for 30 min, washed three times with PBS, and mounted in Mowiol. For dissected guts, tissues were counterstained with DAPI (*Roche*, Cat. #10236276001) for 5 min in the dark. Images were collected using a Leica DM 600B light microscope (*Leica*, Germany), equipped with a Hamamatsu C10600 ORCA-R<sup>2</sup> digital camera.

#### **Statistical analyses.**

All statistical comparisons were done with GraphPad Prism v.5 software. Data were analyzed using the non-parametric Student test between two groups or using the one-way ANOVA test followed by a TUKEY's test correction between more than two groups. Significance levels in figures were represented as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. All quantitative data are reported as the mean ± S.E.M. (Standard Error of the Mean). Lifespan assays were subjected to survival analysis (Log-rank test) using the freely available OASIS software (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/>) (28).



## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.R.M and S.S. conceived and designed the project. S.S., L.M. and J.R.M., performed and analyzed the experiments. S.S. and J.R.M. discussed the results and wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. TRICOIRE (Paris, France), B.A. Edgar (Heidelberg, Germany), G.H. THOMAS (Pennsylvania, UAS), D. VASILIAUSKAS (Gif-sur-Yvette, France), R. BENTON (Lausanne, Switzerland), F. ROUYER (Gif-sur-Yvette) and J.E. O'TOUSA (Indiana, UAS) for fly stocks. This work was supported by the CNRS (France).

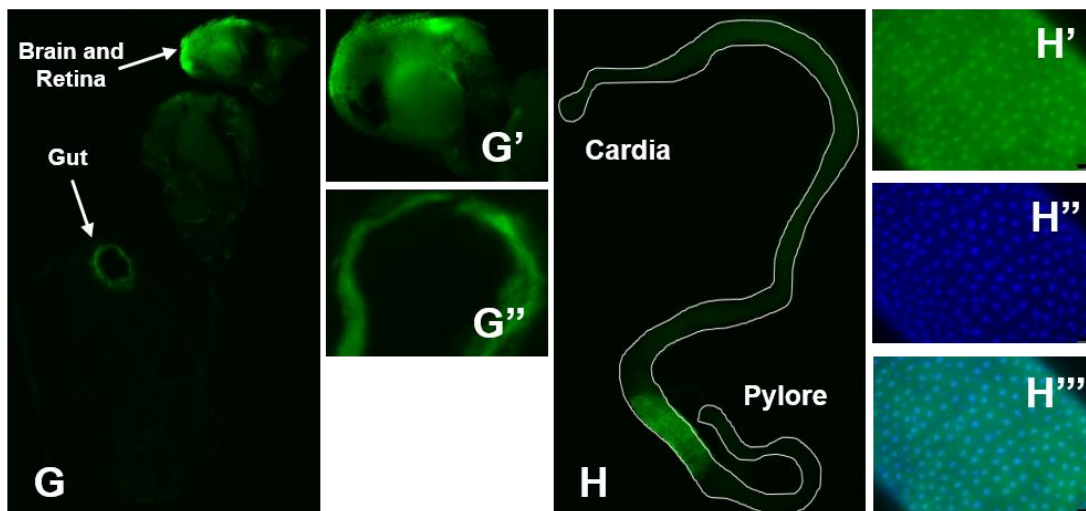
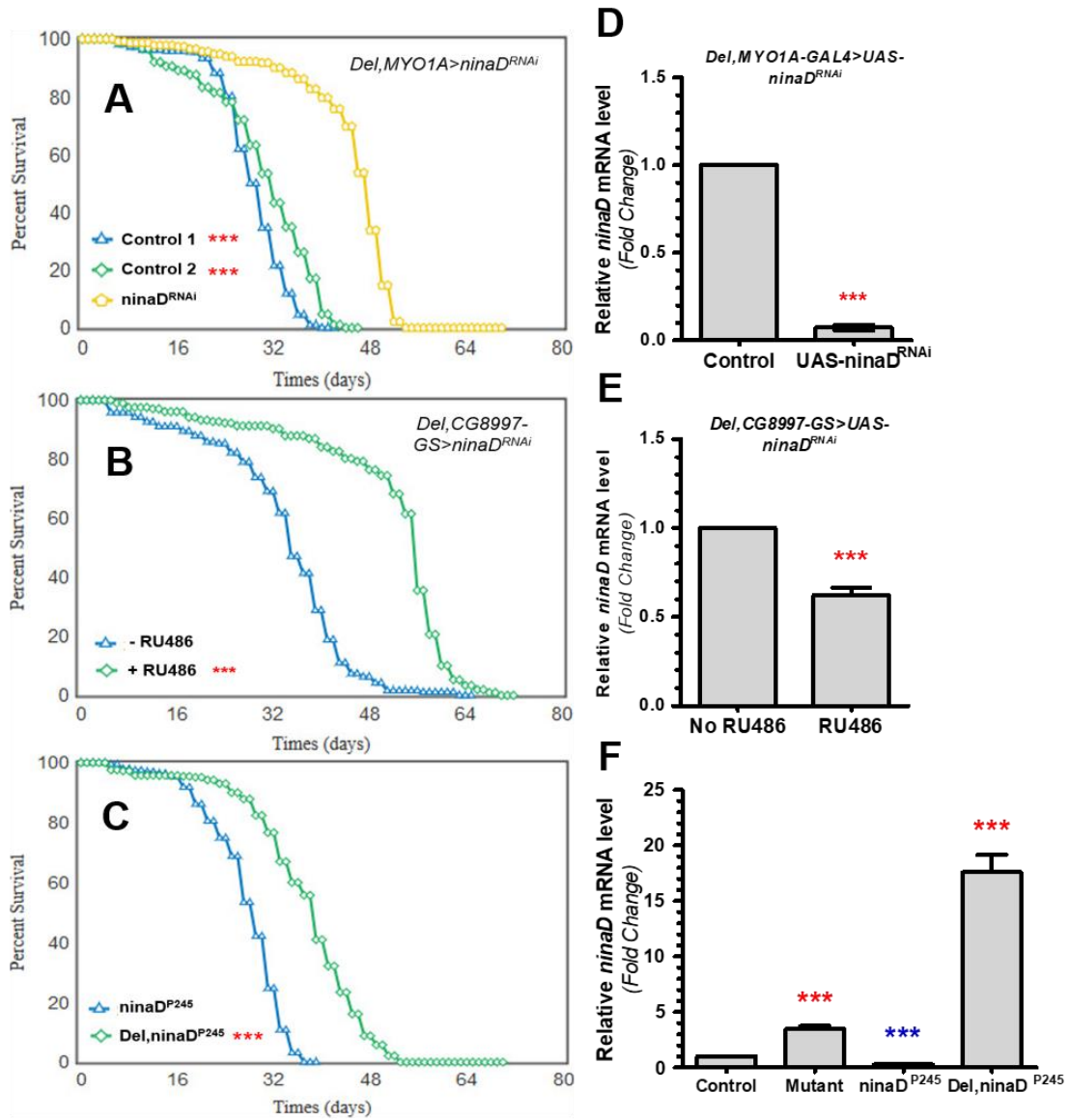
## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. S. Soulé, L. Mellottée, A. Arab, C. Chen, J.-R. Martin, Jouvence a small nucleolar RNA required in the gut extends lifespan in *Drosophila*. *Nat. Commun.* **11**, 1–21 (2020).
2. B. Biteau, C. E. Hochmuth, H. Jasper, JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell* **3**, 442–455 (2008).
3. B. Biteau, *et al.*, Lifespan Extension by Preserving Proliferative Homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **6** (2010).
4. C. Kiefer, E. Sumser, M. F. Wernet, J. von Lintig, A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10581–10586 (2002).
5. G. Gu, J. Yang, K. A. Mitchell, J. E. O'Tousa, *Drosophila* NinaB and NinaD Act Outside of Retina to Produce Rhodopsin Chromophore. *J. Biol. Chem.* **279**, 18608–18613 (2004).
6. J. Yang, J. E. O'Tousa, Cellular sites of *Drosophila* NinaB and NinaD activity in vitamin A metabolism. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 49–56 (2007).
7. O. Voolstra, *et al.*, The *Drosophila* Class B Scavenger Receptor NinaD-I Is a Cell Surface Receptor Mediating Carotenoid Transport for Visual Chromophore Synthesis. *Biochemistry* **45**, 13429–13437 (2006).
8. L. E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 89–99 (2004).
9. M. McMahon, A. Contreras, D. Ruggero, Small RNAs with big implications: New insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**, 173–189 (2015).

10. T. Wang, Y. Jiao, C. Montell, Dissection of the pathway required for generation of vitamin A and for Drosophila phototransduction. *J. Cell Biol.* **177**, 305–316 (2007).
11. S. Acton, *et al.*, Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518–520 (1996).
12. M. de la Llera-Moya, *et al.*, Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **40**, 575–580 (1999).
13. G. Endemann, *et al.*, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 11811–11816 (1993).
14. U. Steinbrecher, Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1436**, 279–298 (1999).
15. R. Ragheb, *et al.*, Interplay between trauma and *Pseudomonas entomophila* infection in flies: a central role of the JNK pathway and of CrebA. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
16. M. de la Llera-Moya, *et al.*, Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J. Lipid Res.* **42**, 1969–1978 (2001).
17. M. A. Connelly, *et al.*, Analysis of Chimeric Receptors Shows That Multiple Distinct Functional Activities of Scavenger Receptor, Class B, Type I (SR-BI), Are Localized to the Extracellular Receptor Domain. *Biochemistry* **40**, 5249–5259 (2001).
18. L. Herboso, A. Talamillo, C. Pérez, R. Barrio, Expression of the Scavenger Receptor Class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 603–611 (2011).
19. X. Huang, J. T. Warren, J. Buchanan, L. I. Gilbert, M. P. Scott, *Drosophila* Niemann-Pick Type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development* **134**, 3733–3742 (2007).
20. S. P. Voght, M. L. Fluegel, L. A. Andrews, L. J. Pallanck, *Drosophila* NPC1b Promotes an Early Step in Sterol Absorption from the Midgut Epithelium. *Cell Metab.* **5**, 195–205 (2007).
21. S. E. Phillips, E. A. Woodruff, P. Liang, M. Patten, K. Broadie, Neuronal Loss of *Drosophila* NPC1a Causes Cholesterol Aggregation and Age-Progressive Neurodegeneration. *J. Neurosci.* **28**, 6569–6582 (2008).
22. M. H. Sieber, C. S. Thummel, Coordination of Triacylglycerol and Cholesterol Homeostasis by DHR96 and the *Drosophila* LipA Homolog magro. *Cell Metab.* **15**, 122–127 (2012).
23. M. A. Horner, *et al.*, The *Drosophila* DHR96 nuclear receptor binds cholesterol and regulates cholesterol homeostasis. *Genes Dev.* **23**, 2711–2716 (2009).
24. C. Gomez-Diaz, *et al.*, A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nat. Commun.* **7**, 1–17 (2016).
25. J.-A. Tschape, The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. *EMBO J.* **21**, 6367–6376 (2002).

26. P. Gamba, *et al.*, Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **7** (2015).
27. E. J. Fernández-Pérez, *et al.*, Effect of Cholesterol on Membrane Fluidity and Association of A $\beta$  Oligomers and Subsequent Neuronal Damage: A Double-Edged Sword. *Front. Aging Neurosci.* **10** (2018).
28. J.-S. Yang, *et al.*, OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research. *PLoS ONE* **6** (2011).
29. Y. H. Belgacem, J.-R. Martin, Disruption of insulin pathways alters trehalose level and abolishes sexual dimorphism in locomotor activity in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **66**, 19–32 (2006).
30. H. Li, J. M. Tennessen, Methods for studying the metabolic basis of *Drosophila* development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **6** (2017).
31. D. Ling, P. M. Salvaterra, Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLoS ONE* **6**, e17762 (2011).
32. W. Song, J. A. Veenstra, N. Perrimon, Control of Lipid Metabolism by Tachykinin in *Drosophila*. *Cell Rep.* **9**, 40–47 (2014).

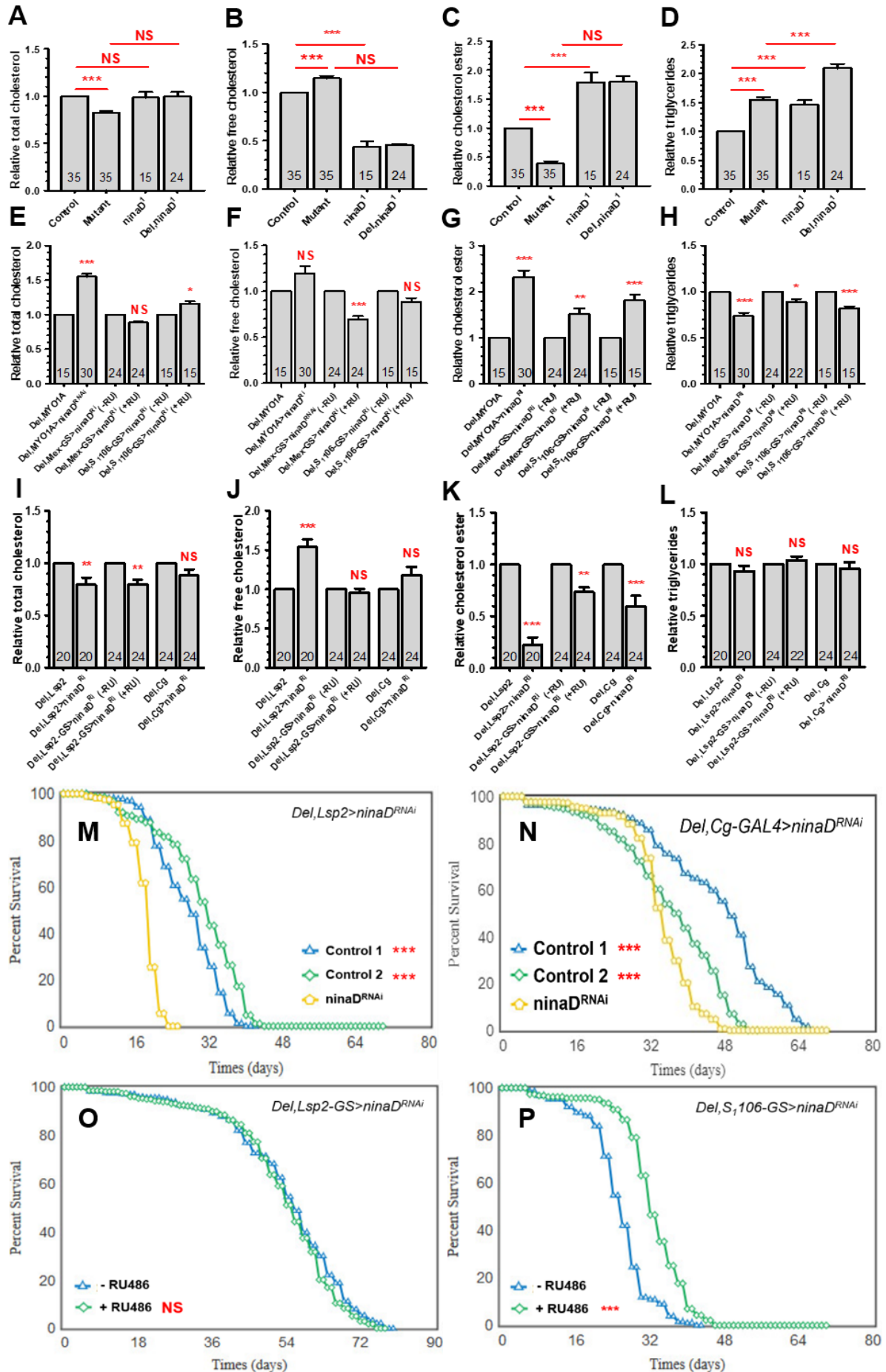
FIGURES AND LEGENDS



R4/R5

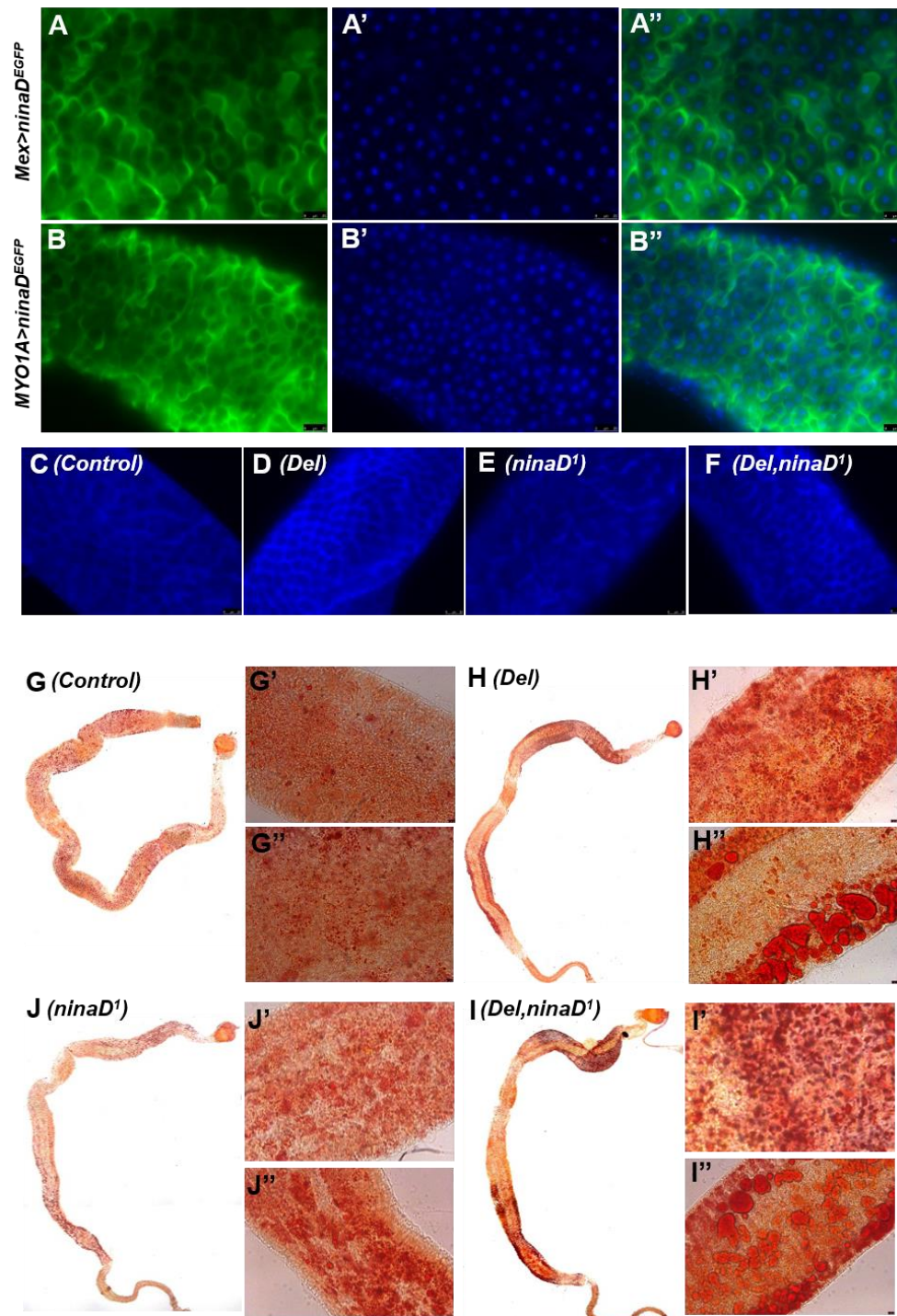
**Figure 1 - Knock-down of *ninaD* mRNA in EC rescues lifespan in *jouvence*-deleted flies.**

**(A - C)** Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative). **(A)** Targeted expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the EC in *jouvence*-deleted flies (*Del,MYO1A>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*) compared to their two respective controls (Control n°1 : *Del,MYO1A-GAL4/Del* and Control n°2 : *Del,UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>>Del*). **(B)** Targeted expression, only in adulthood, of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the EC in *Del,CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* RU486 fed flies compared to their controls (non-fed RU486). **(C)** *ninaD<sup>1</sup>* mutant compared to the double-mutant (*Del,ninaD<sup>1</sup>*). For number of flies, age in days at % mortality and detailed Statistics, see Table S2 (\*\*p < 0.001). **(D - F)** qRT-PCR (SYBR Green) results of the quantification of the *ninaD* mRNA level. **(D)** *Del,MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* correspond to *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* compared to their controls (*Del,MYO1A-GAL4/Del*). **(E)** *Del,CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* RU486 fed flies compared to their controls (non-fed RU486). **(F)** *ninaD<sup>1</sup>* mutant compared to the double-mutant *Del,ninaD<sup>1</sup>*, and to the two other controls (WT CS and *Del*-mutant). (\*\*p < 0.001). Stars highlighting significant comparisons with control (CS) are displayed in **red**, while those highlighting significant comparisons with the mutant (*Del*) are displayed in **blue**. **(G - H)** Analysis of expression pattern of *ninaD* using *ninaD-GAL4* construct driving expression of the *UAS-nls-GFP(4776)* nuclear marker. **(G)** Cryosection of whole fly. The labeling of the cornea is nonspecific because of autofluorescence. GFP is expressed in the epithelium of the gut (**G'**) and the brain (**G''**). Scale bars: 50  $\mu$ m. **(H)** Isolated midgut from *ninaD-GAL4>UAS-nls-GFP(4776)* at 7 days. Scale bars: 100  $\mu$ m (**H' - H''**) Close-up of isolated GFP-expressing midgut cells, more precisely in the R4 and R5 region of the midgut. Scale bars: 25  $\mu$ m.



**Figure 2 - *ninaD* is involved in cholesterol and TG homeostasis.**

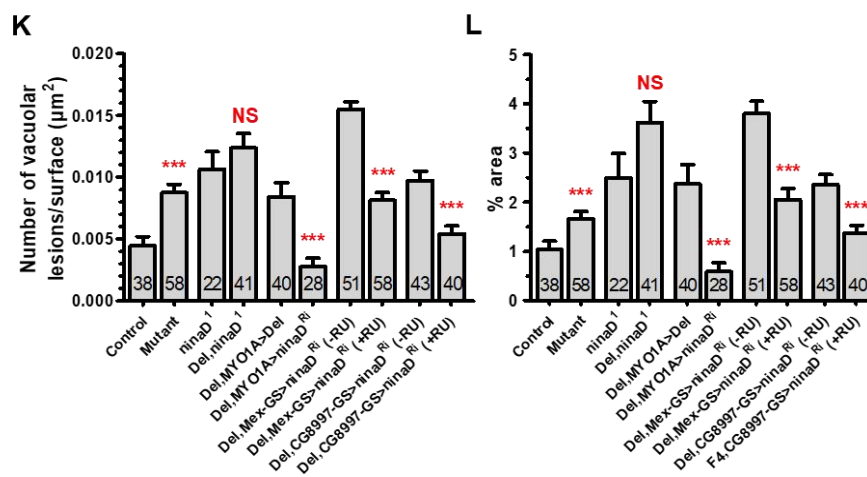
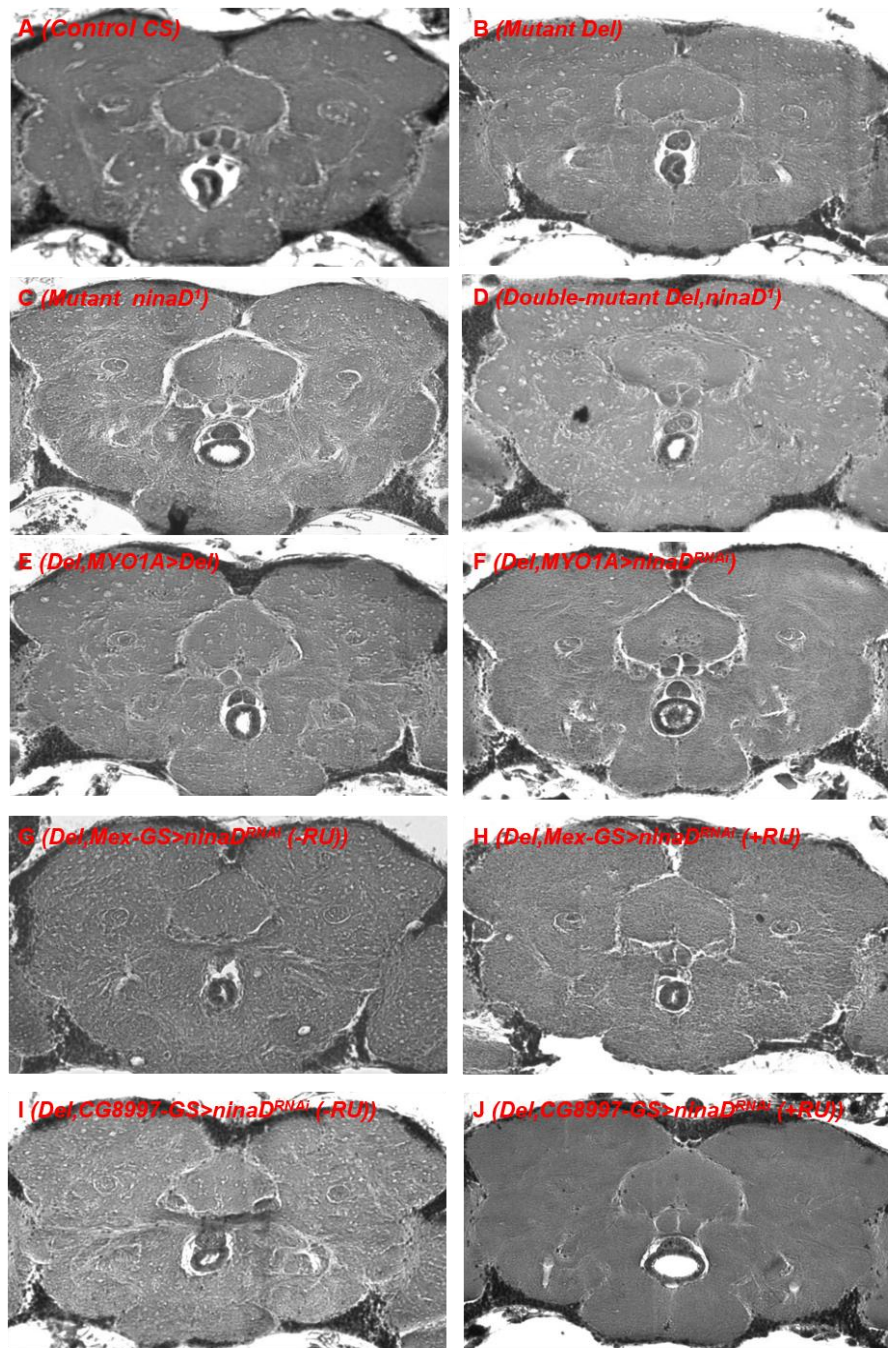
**(A - D)** Quantification of total **(A)**, free **(B)**, ester of cholesterol **(C)**, and of TG **(D)** levels in WT controls (CS), *jouvence*-deleted (*Del*), *ninaD*<sup>1</sup>, and double-mutant (*Del,ninaD*<sup>1</sup>) flies. **(E - H)** Quantification of total **(E)**, free **(F)**, ester of cholesterol **(G)**, and of TG **(H)** levels of the expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> in the EC of the *jouvence*-deleted flies by a GAL4 driver line (*Del,MYO1A-GAL4*), and by two independent conditional expression driver lines, following feeding flies with RU486 only in adulthood (*Del,Mex-GS* and *Del,S1106-GS*). **(I - L)** Quantification of total **(I)**, free **(J)**, ester of cholesterol **(K)**, and of TG **(L)** levels of the expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> in the fat body of the *jouvence*-deleted flies by two GAL4 driver lines (*Del,Lsp2-GAL4* and *Del,Cg-GAL4*), and by an independent conditional expression driver line, following feeding flies with RU486 only in adulthood (*Del,Lsp2-GS*). Numbers in the histograms indicate the number of flies, errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M (\*p < 0.05 ; \*\*p < 0.005 ; \*\*\*p < 0.0005). p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test. **(M - P)** Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative). **(M)** Targeted expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> in the fat body in *jouvence*-deleted flies (*Del,Lsp2-GAL4>UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> correspond to *ninaD*<sup>RNAi</sup>) compared to their two respective controls (Control n°1: *Del,Lsp2-GAL4>Del*, Control n°2 : *Del,UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup>>*Del*). **(N)** Targeted expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> in the fat body in *jouvence*-deleted flies (*Del,Cg-GAL4>UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> correspond to *ninaD*<sup>RNAi</sup>) compared to their two respective controls (Control n°1: *Del,Cg-GAL4>Del*, Control n°2 : *Del,UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup>>*Del*). **(O)** Conditional targeted expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> only in adulthood in the fat body in *jouvence*-deleted flies (*Del,Lsp2-GS>UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup>) fed with RU486 compared to their controls (non-fed with RU486). **(P)** Conditional targeted expression of the *UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup> only in adulthood in the fat body and in the gut in *jouvence*-deleted flies (*Del,S1106-GS>UAS-ninaD*<sup>RNAi</sup>) fed with RU486 compared to their controls (non-fed with RU486) (\*\*p < 0.001). For number of flies, age in days at % mortality and detailed Statistics, see Table S2.



**Figure 3 - *ninaD* is localized in plasma membrane of EC and involved in lipids metabolism.**

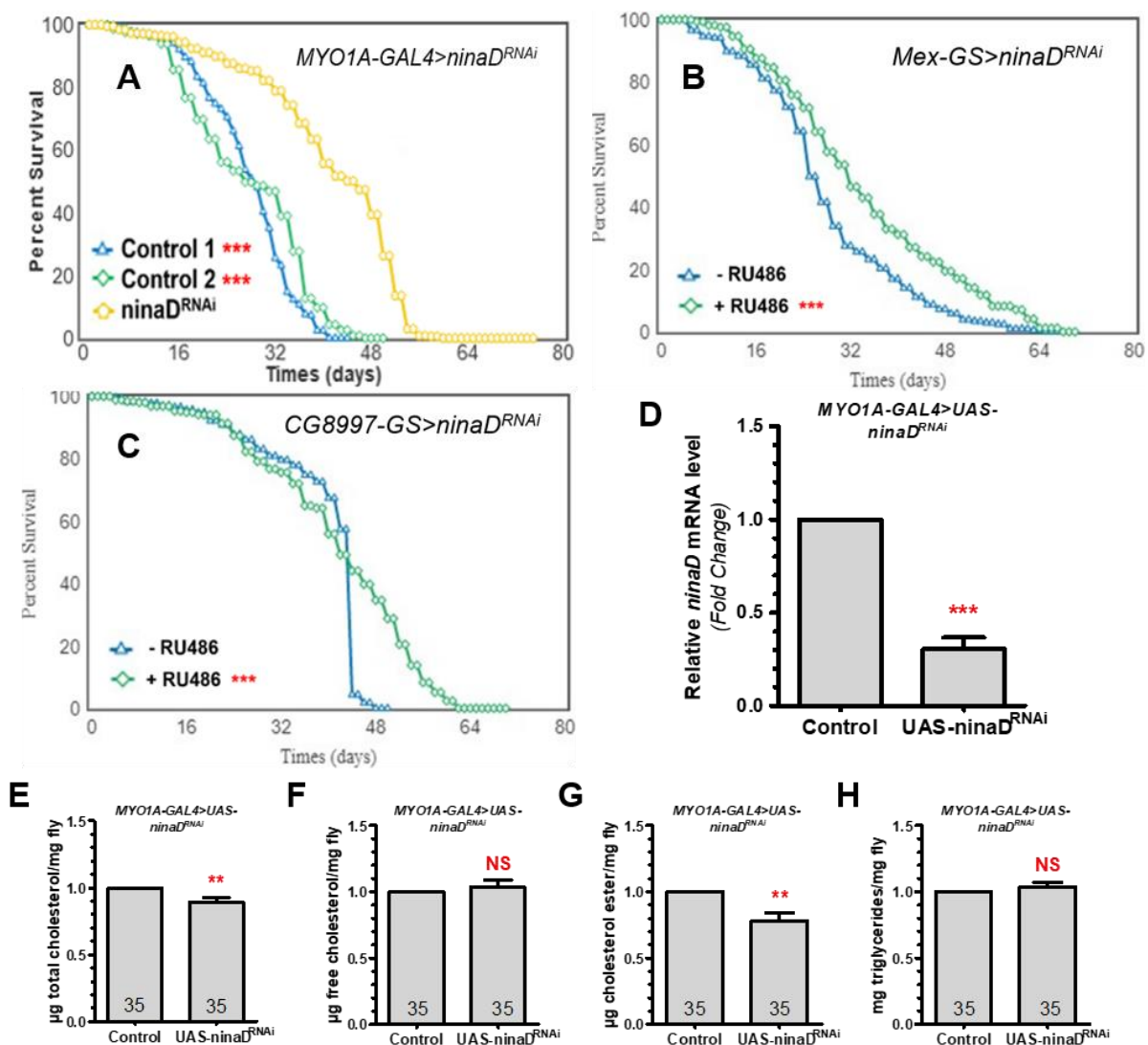
(A - B) *ninaD* is localized in the plasma membrane of the EC. (A) *Mex-GAL4>UAS-ninaD<sup>EGFP</sup>* and (B) *MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>EGFP</sup>*. A and B: GFP (green); A' and B': DAPI staining (blue) and A'' and B'': overlay. (C - F) Filipin staining revealing the unesterified (free) cholesterol in plasma membrane of EC. (C) Control (CS), (D) *jouvence*-deleted (*Del*), (E) *ninaD<sup>1</sup>*, (F) double-mutant (*Del, ninaD<sup>1</sup>*) flies. (G - J) Oil-Red-O stainings revealing the neutral lipids in the epithelium of the gut. (G) Control (CS), (H) *jouvence*-deleted (*Del*), (I) *ninaD<sup>1</sup>*, (J) double-mutant (*Del, ninaD<sup>1</sup>*) flies.





### Figure 4 - Deregulation of *ninaD* leads to neurodegenerative lesions in old flies.

(A - K) 7  $\mu$ m paraffin sections of the brain revealing the neurodegenerative lesions (vacuoles) in the brain. (A) Control (CS), (B) *jouvence*-deleted, (C) *ninaD*<sup>1</sup>, (D) *Del,ninaD*<sup>1</sup>, (E) *Del,MYO1A-GAL4/Del* (control), (F) *Del,MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*, (G) *Del,Mex-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* (-RU), (H) *Del,Mex-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* (+RU), (I) *Del,CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* (-RU), (J) *Del,CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* (+RU). (K) Number of vacuoles for the same genotypes analyzed above. (L) Area of vacuoles (in %) compared to the analyzed surface area of the brain. Numbers in the histograms indicate the number of flies, errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ). p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test.



### Figure 5 – Knock-down of *ninaD* mRNA in EC increases lifespan in WT flies.

(A - C) Longevity test results (survival curve - decreasing cumulative). (A) Targeted expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the EC in WT flies (*MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* correspond to *ninaD<sup>RNAi</sup>*) compared to their two respective controls (Control n°1: *MYO1A-GAL4>CS* and Control n°2: *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>>CS*). (B) Targeted expression, only in adulthood, of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the EC in WT flies (*Mex-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*) fed with RU486 compared to their controls (non-fed

RU486). **(C)** Targeted expression, only in adulthood, of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* specifically in the EC in WT flies (*CG8997-GS>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*) fed with RU486 compared to their controls (non-fed RU486). For number of flies, age in days at % mortality and detailed Statistics, see Table S2 (\*\*\*p < 0.001). **(D)** qRT-PCR (SYBR Green) results of the quantification of the *ninaD* mRNA level of *MYO1A-GAL4>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* correspond to *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>*, compared to their controls (*MYO1A-GAL4>CS*) (\*\*\*p < 0.001). **(E - H)** Quantification of total **(E)**, free **(F)**, ester of cholesterol **(G)**, and TG **(H)** levels, of the expression of the *UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>* in the EC of WT flies by the GAL4 driver line (*MYO1A-GAL4*), compared to their control (*MYO1A-GAL4>CS*). Numbers in the histograms indicate the number of flies, errors bars represent the mean  $\pm$  S.E.M (\*p < 0.05 ; \*\*p < 0.005 ; \*\*\*p < 0.0005). p-value were calculated using the one-way ANOVA followed by a TUKEY test.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Gene Name	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')
<i><math>\alpha</math>-Tub84B</i> (31)	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	AGCAGGCGTTTCCAATCTG
<i>ninaD</i> (32)	ACCAAATGCGGAATAGCAAC	GGCGTAATGCAAAAATTCGT

**Table S1 - qRT-PCR primers used.**

The primer sequences highlighted in orange ( *$\alpha$ -Tub84B*) correspond to those of the household gene used for all qPCRs and with which the results have been normalized.

Figure 1A							
Genotype	Number of flies	Age in days at % mortality					P-value
		25%	50%	75%	90%	100%	
<i>Del,MYO1A-GAL4</i> <sup>(1)</sup> (Control 1)	312	26	28	32	36	40	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>
<i>Del,UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> <sup>(2)</sup> (Control 2)	275	26	32	38	40	44	
<i>Del,MYO1A-GAL4&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> ( <i>ninaD<sup>RNAi</sup></i> )	231	44	48	50	52	54	
Figure 1B							
<i>Del,CG8997-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> (- RU486)	191	29	35	41	45	63	0
<i>Del,CG8997-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> (+ RU486)	208	50	56	58	62	70	
Figure 1C							
<i>ninaD</i> <sup>1</sup>	195	23	29	31	35	37	0
<i>Del,ninaD</i> <sup>1</sup>	330	33	39	43	47	53	
Figure 2M							
<i>Del,Lsp2-GAL4</i> <sup>(1)</sup> (Control 1)	258	22	28	34	36	40	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>
<i>Del,UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> <sup>(2)</sup> (Control 2)	275	26	32	38	40	44	
<i>Del,Lsp2-GAL4&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> ( <i>ninaD<sup>RNAi</sup></i> )	276	17	19	21	21	23	
Figure 2N							
<i>Del,Cg-GAL4</i> <sup>(1)</sup> (Control 1)	236	37	49	55	63	67	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>
<i>Del,UAS-ninaD<sup>RNAi</sup></i> <sup>(2)</sup> (Control 2)	300	29	39	47	49	53	

<i>Del,Cg-GAL4&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (ninaD<sup>RNAi</sup>)</i>	296	31	35	39	43	49	
<b>Figure 2O</b>							
<i>Del,Lsp2-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (- RU486)</i>	277	46	56	64	70	78	0.0583
<i>Del,Lsp2-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (+ RU486)</i>	278	48	56	62	68	76	
<b>Figure 2P</b>							
<i>Del,S<sub>1</sub>106-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (- RU486)</i>	212	22	26	28	34	42	0
<i>Del,S<sub>1</sub>106-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (+ RU486)</i>	187	30	32	38	40	46	
<b>Figure 5A</b>							
<i>MYO1A-GAL4<sup>(1)</sup> (Control 1)</i>	243	24	30	32	34	38	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>
<i>UAS-ninaD<sup>RNAi</sup>(2) (Control 2)</i>	236	15	19	21	25	27	
<i>MYO1A-GAL4&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (ninaD<sup>RNAi</sup>)</i>	236	24	34	38	40	42	
<b>Figure 5B</b>							
<i>Mex-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (- RU486)</i>	207	21	25	35	45	65	0.000003
<i>Mex-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (+ RU486)</i>	170	24	32	44	56	68	
<b>Figure 5C</b>							
<i>CG8997-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (- RU486)</i>	230	36	44	44	44	48	3.3.10 <sup>-8</sup>
<i>CG8997-GS&gt;UAS-ninaD<sup>RNAi</sup> (+ RU486)</i>	254	34	42	52	56	62	

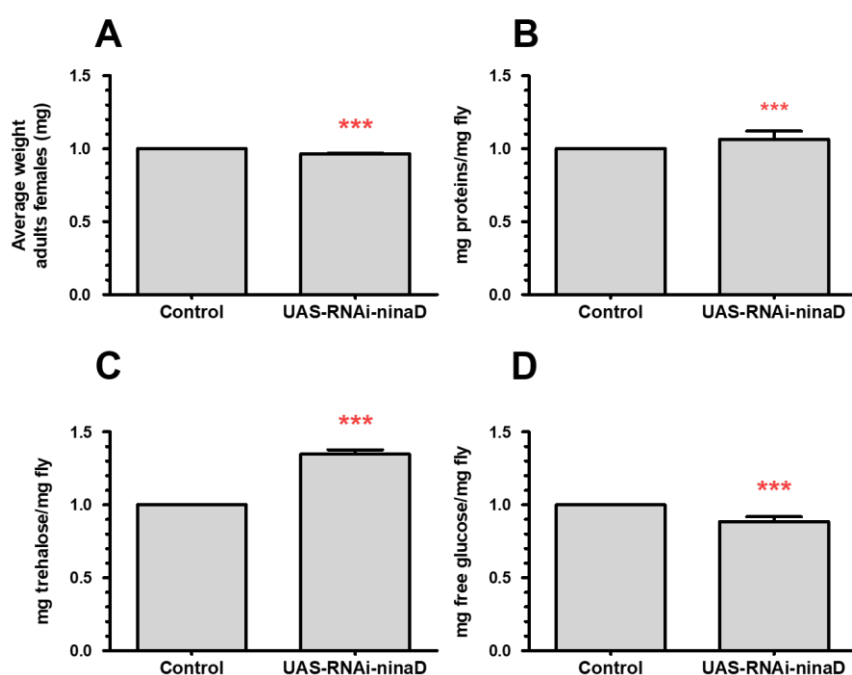
**Table S2 - Statistical summary of longevity tests.**

Longevity tests were performed on non-virgin (mated) female flies. Mating with males lasted 3 days. All crosses were done in the same direction: virgin females \* males. The different GAL4-GS lines used in this study were induced by the addition of RU486 to the standard nutrient medium at a final concentration of 25 µg.mL<sup>-1</sup>, unless otherwise specified. Significant differences between the lines and their respective controls were determined using the log-rank test determined by the OASIS v.2 analysis software (28).

## 2.2. Résultats non inclus dans l'article.

Dans cette étude, nous rapportons que la mutation de *jouvence* conduit à des déficiences métaboliques, telles qu'une augmentation du poids des mouches accompagnée d'une altération énergétique, tandis que l'expression dirigée du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin est suffisante pour maintenir un bon équilibre métabolique chez la mouche. En effet, nos résultats indiquent que la diminution de l'expression de *ninaD* dans l'épithélium de l'intestin conduit notamment à une restauration des niveaux de cholestérol et de TG chez le phénotype mutant. Cependant, certains résultats n'ont pas pu trouver leur place dans le report. Nous allons alors les exposer ici. En plus d'examiner les niveaux en cholestérol et TG, nous avons également déterminé la teneur en glucides (glucose et tréhalose) et en protéines des mouches transgéniques sur certaines lignées.

Notamment, nous avons utilisé des mouches transgéniques exprimant l'*UAS-RNAi-ninaD* spécifiquement dans les EC avec la lignée *MYO1A-GAL4 (F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-ninaD)*. Ces mouches présentaient une perte de poids significative comparées aux mutants, ce qui corrélait avec la diminution de leur contenu en lipides (Fig. 46A). Les niveaux de protéines de ces mouches ont augmenté par rapport à ceux des contrôles génétique (*F4,MYO1A-GAL4>F4*) (Fig. 46B). De plus, pour évaluer l'impact de l'expression de l'*UAS-RNAi-ninaD* dans les EC sur l'homéostasie glucidique, nous avons quantifié les niveaux de glucose libre et de tréhalose. Nous avons trouvé des niveaux de tréhalose significativement élevés (Fig. 46C), mais une teneur en glucose libre réduite par rapport aux mutants (Fig. 46D).

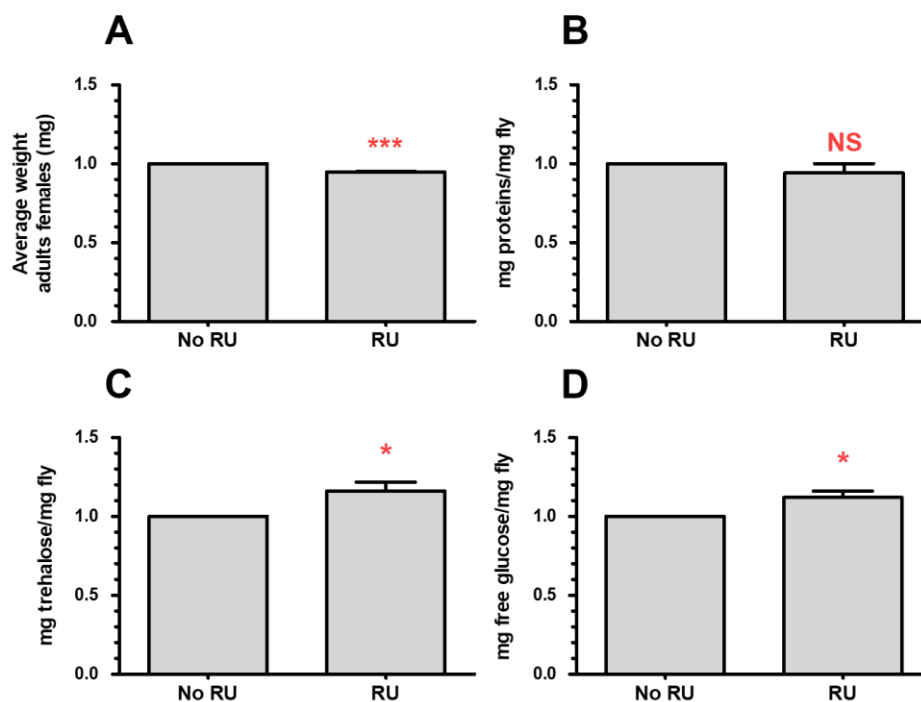


**Figure 46 – L'expression de l'*UAS-RNAi-ninaD* dans les EC module le poids corporel et l'homéostasie glucidique.**

(A) Masse corporelle moyenne (mg) d'une mouche (n = 164 mouches par génotype). (B) Niveau total de protéines (n = 45

- 90 mouches par génotype). **(C)** Détermination des niveaux de tréhalose (n = 14 - 30 mouches par génotype). **(D)** Quantification du niveau de glucose libre (n = 14 - 30 mouches par génotype). La quantification des différents paramètres métaboliques et des protéines a été réalisée sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre le *F4,MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-ninaD* et son contrôle génétique *F4,MYO1A-GAL4>F4*. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d'une mouche. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

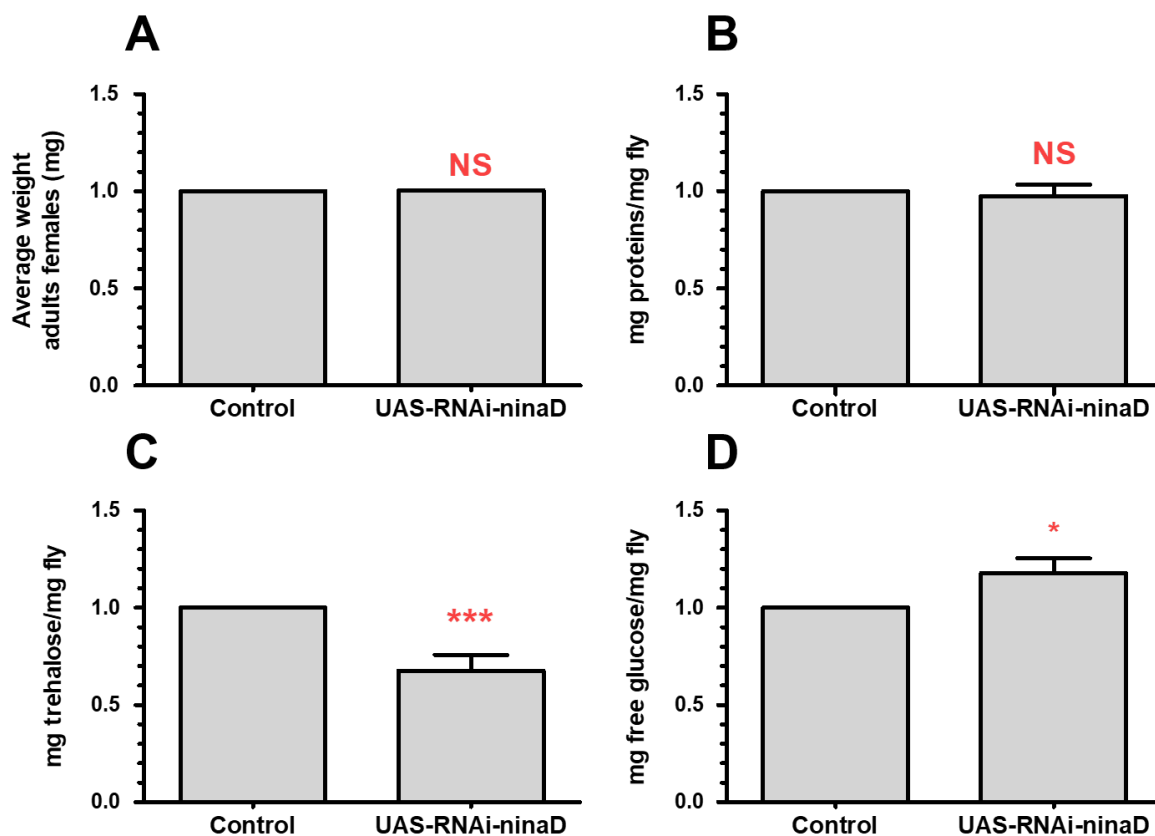
Alors que la lignée *MYO1A-GAL4* active l'expression de l'ARNi dans les EC, mais pas nécessairement qu'au stade adulte, nous avons dirigé l'expression de l'*UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin avec une autre lignée inductible au RU486, *Mex-GAL4-GS (F4,Mex-GAL4-GS>UAS-RNAi-ninaD)* mais uniquement au cours de l'âge adulte. En accord avec les résultats obtenus précédemment, nous avons également observé des changements significatifs dans les niveaux de glucose (Fig. 47D) et de tréhalose (Fig. 47C), mais en revanche rien pour les protéines (Fig. 47B). De plus, les mouches transgéniques affichent aussi un poids considérablement plus bas que les mutants (Fig. 47A).



**Figure 47 – Evaluation de l'état métabolique des mouches avec une expression temporelle du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin.**

**(A)** Masse corporelle moyenne (mg) d'une mouche (n = 74 mouches par génotype). **(B)** Niveau total de protéines (n = 33 - 48 mouches par génotype). **(C)** Détermination des niveaux de tréhalose (n = 9 - 11 mouches par génotype). **(D)** Quantification du niveau de glucose libre (n = 9 - 15 mouches par génotype). La quantification des différents paramètres métaboliques et des protéines a été réalisée sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre les *F4,Mex-GAL4-GS>UAS-RNAi-ninaD* induites ou non au RU486. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d'une mouche. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

D'après les données issues du modENCODE, une très faible expression de *ninaD* a aussi été détectée dans le corps gras adulte (Fig. 44). Dans notre étude, nous avons voulu évaluer l'effet de l'expression du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans ce tissu sur le métabolisme lipidique. Nous avons profité pour évaluer son impact sur les niveaux d'hydrates de carbones et de protéines. Les mouches transgéniques exprimant l'*UAS-RNAi-ninaD* dans le corps gras avec la lignée *Lsp2-GAL4* (*F4,Lsp2-GAL4>UAS-RNAi-ninaD*) ne voient pas de changements dans leur teneur en protéines (Fig. 48B). Cependant, les niveaux de tréhalose sont diminués (Fig. 48C) et ceux du glucose augmentés par rapport aux mutants (Fig. 48D). De plus, aucune différence significative n'a été observée dans le poids des mouches (Fig. 48A).



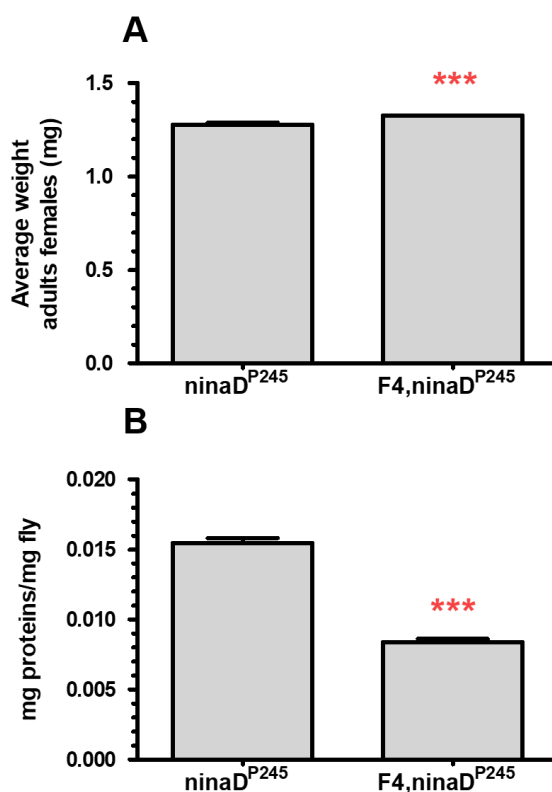
**Figure 48 – Effet de l'expression ciblée du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans le corps gras sur l'activité métabolique.**

(A) Masse corporelle moyenne (mg) d'une mouche (n = 80 mouches par génotype). (B) Niveau total de protéines (n = 59 mouches par génotype). (C) Détermination des niveaux de tréhalose (n = 20 mouches par génotype). (D) Quantification du niveau de glucose libre (n = 20 mouches par génotype). La quantification des différents paramètres métaboliques et des protéines a été réalisée sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre le *F4,Lsp2-GAL4>UAS-RNAi-ninaD* et son contrôle génétique *F4,Lsp2-GAL4>F4*. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d'une mouche. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

Alors que les mutants *jouvence* présentaient des différences significatives dans les niveaux de TG et de cholestérol mais que la simple expression du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin a permis de



restauration des niveaux de ces différents métabolites, nous avons voulu également déterminer la quantité de TG et de cholestérol chez les mutants nuls *ninaD*<sup>P245</sup> (aussi appelés *ninaD*<sup>1</sup>), mais qui présentent quand même un niveau d'expression très faible du gène *ninaD*, et aussi chez les double-mutants *F4,ninaD*<sup>P245</sup> (aussi appelés *F4,ninaD*<sup>1</sup>). De façon remarquable, les résultats révèlent que les mouches mutées pour *ninaD* (*ninaD*<sup>P245</sup>) affichent un phénotype inverse à celui du mutant *F4* avec notamment un niveau élevé d'ester de cholestérol et un niveau faible de cholestérol libre. En revanche, les double-mutants ont un niveau plus élevé de TG par rapport aux mutants nuls pour *ninaD* mais aussi par rapport aux mutants nuls pour *jouvence*. Des expérimentations supplémentaires ont en outre montré que les mouches *F4,ninaD*<sup>P245</sup> sont beaucoup plus grosses que les *ninaD*<sup>P245</sup> et les *F4*, sans doute à cause de leur niveau important de TG (Fig. 49A). En revanche, une diminution significative de leur teneur en protéines est constatée chez les double-mutants (Fig. 49B).



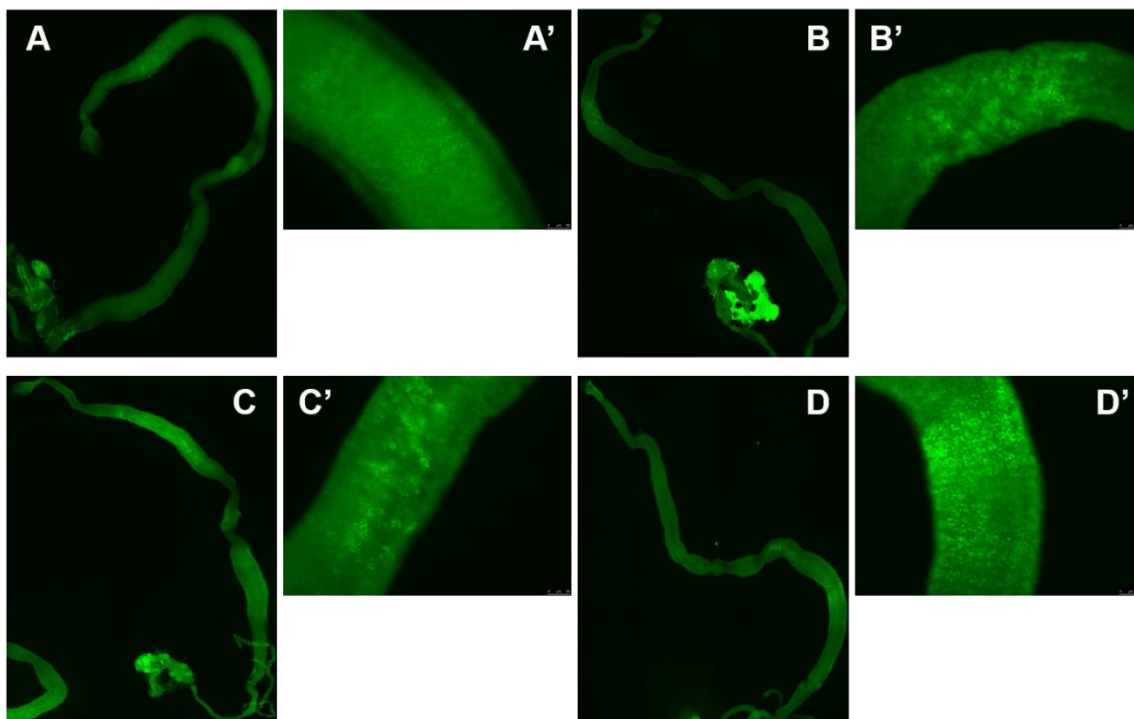
**Figure 49 – Evaluation des paramètres métaboliques des mutants nuls *ninaD*<sup>P245</sup> et des doubles mutants *F4, ninaD*<sup>P245</sup>.**

(A) Masse corporelle moyenne (mg) d'une mouche (n = 30 à 48 mouches par génotype). (B) Niveau total de protéines (n = 15 à 24 mouches par génotype). La quantification des protéines a été réalisée sur des corps entiers de femelles âgées de 7 jours entre le mutant nul *ninaD*<sup>P245</sup> et le double-mutant *F4,ninaD*<sup>P245</sup>. Les quantités ont ensuite été rapportées au poids moyen d'une mouche. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test de Student non-paramétrique : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

Nous avons constaté que le métabolisme lipidique des mutants nuls pour *jouvence* est perturbé comme le montrent les niveaux élevés de lipides. Ces lipides sont stockés dans des gouttelettes lipidiques, qui sont les organites multifonctionnels de stockage des lipides dans les cellules. Les gouttelettes lipidiques varient

en taille et en nombre selon les tissus et les conditions. Pour tester si la perte de *jouvence* influence la distribution des gouttelettes lipidiques, nous avons réalisé une coloration au Nile Red de l'intestin. Tout d'abord, nous constatons que les gouttelettes lipidiques sont plus abondantes dans les EC situés dans les régions antérieure et postérieure de l'intestin adulte des mouches contrôles (Fig. 50A et A'). Cependant, nous montrons que la mutation de *jouvence* a modifié la distribution des gouttelettes lipidiques dans l'intestin. Les gouttelettes lipidiques paraissent plus denses en lipides dans l'intestin d'adultes âgés de 7 jours des mutants, alors que les gouttelettes lipidiques des mouches contrôles n'ont pas subi de variations. En effet selon la région, la fluorescence paraît plus intense dans l'intestin des mutants *F4* (Fig. 50B et B'). Nous démontrons que l'élévation des niveaux de TG est accompagnée d'une accumulation défectueuse des lipides cellulaires, comme en témoigne un changement drastique de la quantité des gouttelettes lipidiques intracellulaires présentes dans les EC. De plus, nous avons également réalisé des colorations au Nile Red sur les intestins des génotypes *ninaD<sup>P245</sup>* et *F4,ninaD<sup>P245</sup>*. En plus de moduler l'homéostasie du cholestérol, nous avons remarqué que le gène *ninaD* était aussi capable de réguler les niveaux de TG par rapport aux mouches de type sauvage. De ce fait, nous avons voulu visualiser les gouttelettes lipidiques de ces génotypes dans l'intestin. Nous avons trouvé que les mutants nuls *ninaD<sup>P245</sup>* et les doubles-mutants *F4,ninaD<sup>P245</sup>* favorisent l'accumulation lipidique intracellulaire comme les mutants *jouvence* (Fig. 50C, C', D et D'). La majorité des EC de l'intestin semblent être gorgés de lipides comparés à ceux des mouches contrôles au même âge. Nos résultats suggèrent fortement que la mutation de *jouvence* ou de *ninaD* entraîne une fluctuation des dépôts de lipides intracellulaires dans l'intestin par son effet sur l'homéostasie métabolique.

Nos résultats soutiennent l'idée que l'expression du transgène *UAS-RNAi-ninaD* exclusivement dans l'intestin permet de maintenir l'homéostasie des lipides et du cholestérol, qui reste centralement affecté chez les mutants nuls pour *jouvence*. Cependant, des changements substantiels dans la teneur en glucides et en protéines n'ont pas été observés (données non présentées), suggérant que *ninaD* n'agit pas sur ces paramètres.



**Figure 50 – La mutation de *jouvence* augmente le stockage des lipides dans l'intestin moyen.**

(A – D) Images représentatives d'intestins moyen adulte de drosophiles des génotypes suivants âgés de 7 jours : les contrôles *CS* (A et A'), les mutants *F4* (B et B'), les mutants *ninaD<sup>P245</sup>* (C et C') et les double-mutants *F4;ninaD<sup>P245</sup>* (D et D') colorés au Nile Red (gouttelettes lipidiques, vert). Les images A', B', C' et D' correspondent à des grossissements d'une région spécifique de l'intestin pour chacun des génotypes. Au moins six intestins ont été disséqués pour chaque génotype. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m (10X) et 50  $\mu$ m (20X).

### 3. Discussion.

#### 3.1. Une fonction de *ninaD* dans l'homéostasie du cholestérol.

Précédemment, nous avons démontré que le snoARN à boîtes H/ACA *jouvence* est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. En effet, nous avons établi que la perte de *jouvence* diminue l'estérification du cholestérol, probablement en canalisant le cholestérol hors du pool accessible à l'ACAT, et favorise l'accumulation de cholestérol non-estérifié dans les membranes plasmiques, révélant ainsi un mécanisme de régulation du flux de cholestérol vers le RE altéré. La comparaison des transcriptomes entre la lignée mutante et le WT a permis d'identifier 316 gènes régulés à la hausse et 319 gènes régulés à la baisse chez les mutants par rapport aux mouches contrôles. Parmi ceux-ci, nous avons choisi de nous concentrer sur l'homologue du récepteur Scavenger de classe B des mammifères (SR-BI), *ninaD*, dont l'expression a été multipliée par trois chez les mutants par rapport au WT (313). Chez les mammifères, le SR-BI est connu pour médier l'absorption cellulaire du cholestérol à partir de particules de lipoprotéines de haute densité (HDL), et est particulièrement abondant dans le foie et les tissus stéroïdogènes (335). En outre, l'expression de SR-BI

dans les EC de l'intestin grêle a également été rapportée (338). Nous avons alors pensé que la dérégulation du gène *ninaD* pourrait en partie expliquer le déséquilibre observé chez les mutants *F4* dans l'homéostasie du cholestérol.

Initialement, *ninaD* a été identifié comme une protéine transmembranaire essentielle pour l'absorption cellulaire des caroténoïdes chez la drosophile. Or, les résultats obtenus ont soulevé la possibilité que l'estérification modifiée du cholestérol chez les mutants déficients en snoARN *jouvence* reflète probablement d'un défaut dans la livraison du cholestérol des membranes plasmiques aux RE donc de la dérégulation de *ninaD*. Nous supposons alors que *ninaD* pourrait être requis dans l'homéostasie des stérols et faciliterait le flux de cholestérol de la membrane plasmique vers le RE. Après avoir normalisé le niveau d'expression élevé de *ninaD* lorsque le mutant *F4* a été sauvé par l'inactivation de *ninaD* par un ARNi spécifiquement dans l'intestin de la lignée mutante, les résultats ont montré que l'inhibition de son expression était suffisante pour rétablir l'estérification du cholestérol à celle du WT. Ainsi, le défaut de cholestérol a pu être sauvé par l'expression d'un transgène génomique *UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin des mouches adulte mutantes, indiquant qu'il résulte en partie d'une perte spécifique de la fonction *ninaD* dans ce tissu.

Dans le présent travail, les analyses histologiques ont révélé que *ninaD* est principalement exprimé à la surface des EC de l'intestin moyen de mouches adultes, plus particulièrement dans les zones R4 et R5 où l'absorption du cholestérol est optimale. On peut donc imaginer que cette localisation subcellulaire de *ninaD* pourrait suggérer un rôle supplémentaire en tant que médiateur de l'absorption du cholestérol alimentaire. Or, l'observation selon laquelle l'absorption du cholestérol n'est pas réduite chez les mutants *ninaD<sup>P245</sup>*, illustrée par des niveaux de cholestérol total inchangés, plaide contre le rôle essentiel du récepteur dans l'absorption intestinale du cholestérol. Effectivement, nous avons découvert que la souche *ninaD<sup>P245</sup>*, qui porte une mutation non-sens provoquant une interruption prématurée de la traduction de la protéine *ninaD*, présente une augmentation de l'absorption du cholestérol, évaluée par une augmentation des niveaux d'ester de cholestérol. De plus, une étude a montré que le gène *ninaD* code pour deux variantes de protéines, *ninaD-I* et *ninaD-II*. Ces deux isoformes résultent de l'épissage alternatif de l'ARNm de *ninaD* qui sont toutes deux des protéines liées à la membrane mais sont localisées dans différents compartiments subcellulaires. *ninaD-I*, la variante protéique longue, est localisée au niveau de la membrane plasmique, tandis que la variante courte, *ninaD-II*, est localisée au niveau des membranes intracellulaires (345). Ainsi, *ninaD* joue un double rôle dans le transport du cholestérol, d'abord en rendant le cholestérol alimentaire disponible au stade adulte et en second lieu pour distribuer le cholestérol acquis, très probablement sous forme d'ester de cholestérol aux cellules cibles.

Bien que les résultats actuels n'excluent pas la possibilité que *ninaD* soit impliqué dans le métabolisme du cholestérol, la fonction de *ninaD* reste à être élucidée. Toutefois sur la base des résultats présentés ici, notre étude révèle un rôle évolutif conservé de *ninaD* dans le transport du cholestérol chez la drosophile. En effet, nous avons constaté que les fonctions de *ninaD* ne se limitent pas aux caroténoïdes mais peuvent également contribuer au métabolisme du cholestérol.

### 3.2. La fonction intestinale de *ninaD* fournit une neuroprotection.

Chez les mammifères, le cerveau est l'organe du corps le plus riche en cholestérol. La capacité du cerveau à stocker une si grande quantité de cholestérol indique que ce stérol joue un rôle central dans le développement et le fonctionnement du cerveau. Environ 70% du cholestérol cérébral se trouve dans la myéline, alors que les 30% restants sont répartis entre les cellules gliales (20%) et les neurones (10%) (346). Le cholestérol est notamment impliqué dans la formation des axones et des dendrites au cours du développement, dans la réparation et le remodelage neuronal, dans la formation de nouvelles synapses, ainsi que dans l'apprentissage et la mémoire (346). Or, une suraccumulation de cholestérol dans le cerveau est cytotoxique et peut être associée à des troubles neurodégénératifs, tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Niemann-Pick de type C, la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington (346). De même, une altération dans l'homéostasie du cholestérol peut entraîner un défaut dans la synthèse de la gaine de myéline et sa perte est attribuable à la neurodégénérescence (346). C'est pourquoi les niveaux de cholestérol sont étroitement contrôlés par le corps. Un élément essentiel de cette homéostasie est l'estérification du stérol libre par l'ACAT, car, en effet, les esters de cholestérol sont moins cytotoxiques que le cholestérol libre (347). Ainsi, le transport intracellulaire du cholestérol est essentiel pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Les voies fondamentales du métabolisme du cholestérol reposent toutes sur sa bonne distribution intracellulaire entre les organelles sous-cellulaires et la membrane plasmique, empêchant ainsi la toxicité des stérols libres (347). Contrairement aux mammifères, les drosophiles ne peuvent pas synthétiser des stérols, car leur génome est dépourvu de certains des gènes codant pour des enzymes nécessaires à la synthèse *de novo*. Par conséquent, les drosophiles doivent obtenir le cholestérol directement à partir de l'apport alimentaire (348). De ce fait, des altérations dans le métabolisme des stérols peuvent être mortelles pour les mouches.

Dans la présente étude, nous avons montré que la perte de *jouvence* a un impact important sur le trafic de cholestérol, avec notamment une surabondance de cholestérol non-estérifié et une diminution considérable des taux d'ester de cholestérol. De plus, le corps gras péricérébral des mouches dépourvues de *jouvence* accumulent des agrégats de cholestérol positifs pour la filipine, qui n'ont pas été observés dans celui des mouches de type sauvage (données non représentées). Les taux de cholestérol élevés, la mort prématurée et l'accumulation d'agrégats de cholestérol dans le corps gras péricérébral des mutants *F4* suggèrent alors une détérioration neuronale progressive. En effet, la suppression de *jouvence* entraîne une neurodégénérescence. Cependant, les mutants nuls pour *jouvence* ne présentent pas une perte neuronale apoptotique dans le cerveau central. Effectivement, aucune trace de cellules apoptotiques n'a été détectée dans le cerveau adulte des mouches mutantes d'après les expériences immunohistochimiques avec l'anticorps anti-caspase 3 activée (données non représentées). Nous supposons alors que ces lésions neurodégénératives sont probablement un effet secondaire au désordre métabolique. Précédemment, nous avons révélé un nouveau rôle de *ninaD* dans le métabolisme du cholestérol chez la drosophile. En effet, l'expression ciblée du transgène *UAS-RNAi-ninaD*

dans l'intestin des lignées mutantes a permis de restaurer les niveaux de cholestérol à la normale. En outre, le raccourcissement de la durée de vie et la neurodégénérescence sont tous sauvés par l'expression ciblée du transgène *UAS-RNAi-ninaD* dans l'intestin. Nous rapportons alors que la fonction intestinale de *ninaD* est nécessaire pour le maintien de la fonction et de la viabilité neuronale.

Nous montrons clairement ici que la fonction de *ninaD* dans l'intestin offre une protection contre la neurodégénérescence associée au vieillissement et un sauvetage significatif pour la mortalité précoce des mutants *jouvence*. Ce phénotype suggère aussi une relation métabolique entre l'expression du snoARN dans l'intestin, les lésions neurodégénératives et l'augmentation de la durée de vie (axe intestin-cerveau). De plus, des interventions thérapeutiques visant les voies métaboliques et/ou cataboliques lipidiques peuvent s'avérer efficaces pour retarder l'apparition des lésions neurodégénératives.

# **Chapitre 4 : Rôle de *jouvence* dans le développement et la physiologie intestinale.**

## **1. Introduction.**

Il a souvent été considéré que les tissus post-développements conservaient une taille constante. Or, la taille n'est pas un attribut fixe mais peut osciller en fonction de l'état physiologique et des conditions environnementales (349) (350). La régulation de la taille des organes est fondamentale chez les organismes multicellulaires et se fait par le contrôle du nombre et/ou de la taille des cellules pour atteindre ses dimensions finales par rapport à la taille de l'organisme (351). Dès le plus jeune âge, les mouches déficientes pour *jouvence* ont montré un taux de renouvellement des cellules et un indice mitotique des CSI élevé. Compte tenu des résultats décrits précédemment, nous postulons que l'intestin des mouches se redimensionne en réponse à la mutation de *jouvence*.

Cette modulation dans la croissance des cellules, des organes et du corps est à la fois contrôlée par des signaux intrinsèques (facteurs de croissance, etc...) et extrinsèques (disponibilité des nutriments, température, etc...) (349) (350). Chez les mammifères, on sait que les hormones et les facteurs de croissance jouent un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance des organismes (351). Nous avons notamment la voie de signalisation à l'insuline/IGF (IIS) qui sont des régulateurs centraux de la croissance des organismes chez les invertébrés et les vertébrés. La voie IIS comprend à la fois des ligands peptidiques, qui peuvent agir à distance, et des composants intracellulaires. Chez les mammifères, les ligands comprennent l'insuline, les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF) et les relaxines. La sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques et le récepteur de l'insuline (IR) contrôlent le métabolisme des glucides et des lipides (352) et la croissance embryonnaire (132), tandis que les facteurs de croissance, IGF-I et IGF-II, et le récepteur IGF-IR régulent la croissance embryonnaire et post-embryonnaire (353), et la longévité (87). Les relaxines, quant à elles, sont produites par l'ovaire et sont impliquées dans la reproduction. Il a été montré que la réduction des niveaux de l'hormone de croissance ou de ses médiateurs affecte fortement la taille du corps et des organes (354) (355).

Des études génétiques et physiologiques sur la drosophile ont permis de montrer que cette voie IIS est remarquablement bien conservée au cours de l'évolution (356). Le génome de la drosophile code pour huit peptides de type insulinique (Dilp 1 - 8) (144) (357), ainsi qu'un seul récepteur d'insuline (dInR) et les composants intracellulaires de la branche canonique PI3K/AKT. Lors de l'activation, ceux-ci émettent un signal pour phosphoryler et inactiver le facteur de transcription dFOXO par exclusion nucléaire (134). Ce système est suspecté remplir les fonctions combinées de l'insuline de mammifères, de l'IGF-I et des relaxines dans le contrôle de la croissance tissulaire, mais aussi dans le métabolisme, la longévité, le développement et la

reproduction. En effet, l'étude des nombreux mutants de la voie de réponse à l'insuline a clairement établi l'importance de ce mécanisme humoral dans le contrôle de la croissance et du métabolisme en fonction des conditions environnementales. Plusieurs études ont montré que les pertes de fonction des gènes codant pour des composants conservés de la voie de signalisation de l'insuline (*Dilp*, *dInR*, *chico*, *dPI3K*, *dAKT*, *dPDK1*, *dS6K*, *dFOXO*) entraînent des effets pléiotropiques sur la croissance, le développement, l'homéostasie métabolique et la reproduction (134) (144) (358) (359) (360) (361). Par exemple, les drosophiles mutantes pour *chico*, l'unique substrat du récepteur de l'insuline des mouches, ont un retard de développement, une taille corporelle fortement réduite et une augmentation de la graisse, et les femelles sont stériles (358). De même, la perte de la fonction de l'IRS-1 chez les souris peut entraîner une réduction sévère de la croissance embryonnaire et post-embryonnaire (354), alors que la perte de l'IRS-2 n'entraîne qu'une réduction modérée de la croissance, mais les souris deviennent hyperglycémiques et contiennent plus de graisse corporelle, et les femelles sont stériles (355). Une variation dans l'activité de l'homologue du récepteur de l'insuline chez la drosophile (*dInR*) peut aussi réguler la taille du corps et des organes en modifiant le nombre et la taille des cellules (144). De plus, d'autres études ont montré que les *Dilp* portent à la fois les fonctions métaboliques de l'insuline et les fonctions de croissance des IGF (362) (363). De plus, chaque peptide possède son propre schéma d'expression spatio-temporel caractéristique et peut ainsi engendrer des effets différents. Par exemple, chez la larve, le *Dilp4* est exprimé dans l'intestin moyen, alors que le *Dilp6* est exprimé principalement dans le corps gras des larves et des adultes (144). Le *Dilp7* est exprimé dans des neurones spécifiques qui innervent l'appareil reproducteur femelle et leur inactivation entraîne la stérilité des mouches, ce qui suggère que le *Dilp7* pourrait être une relaxine (364). Les *Dilp1*, *2*, *3* et *5* sont exprimés dans les cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis* du cerveau de la larve (144) (365) (366), mais seuls les *Dilp2*, *3* et *5* ont pu être détectés chez la mouche adulte (142). Le *Dilp2* est également exprimé au cours du développement dans les disques imaginaux et dans les glandes salivaires, et le *Dilp5* dans les cellules folliculaires de l'ovaire femelle (50). De plus, une étude récente a révélé que le *Dilp3* était aussi détecté dans les cellules musculaires circulaires de l'intestin de la mouche adulte (270) (367). Une perturbation dans la régulation des *Dilp* entraîne aussi de multiples défauts de croissance et de développement. Ces diverses données démontrent une conservation frappante du rôle de la voie de signalisation de l'insuline/IGF au cours de l'évolution.

En plus de la dysplasie intestinale observée chez les mutants *jouvence*, les résultats du séquençage d'ARN ont révélé une dérégulation dans l'expression des gènes *Dilp3* et *Dilp4* (313). En effet, le niveau en ARNm du gène *Dilp3* est fortement diminué, alors que celui du *Dilp4* est régulé à la hausse (Tabl. XIII). Or, une récente étude a montré qu'une source de *Dilp3* spatialement discrète est essentielle à la croissance adaptative de l'intestin moyen en agissant directement sur les CSI pour stimuler leur prolifération. Il a notamment été démontré que ce mécanisme de redimensionnement d'un organe mature est sensible aux signaux nutritionnels. Effectivement, la niche d'insuline de l'intestin moyen oscille dynamiquement pendant l'alimentation et le jeûne, en tandem avec la taille des organes (274). Toutes ces indications suggèrent que les mouches mutantes adultes subissent un changement dans la taille de leur intestin. Pour tester cette hypothèse,



nous avons procédé à la mesure de la longueur de l'intestin des mouches adultes à différents âges et ainsi voir si la mutation de *jouvence* a un impact sur la croissance tissulaire.

Gène	FlyBase ID	Taux	qPCR	Processus Biologique	Fonction Moléculaire	Composant Cellulaire
<b><i>Dilp3</i></b>	FBgn0044050	-1,14	0,29	Processus métabolique	Activité hormonale – Liaison aux	Espace extracellulaire
<b><i>Dilp4</i></b>	FBgn0044049	2,93	ND	(Voie de signalisa- tion de l'insuline)	récepteurs de l'insuline	

**Tableau XIII – Les *Dilp* dont l'expression est dérégulée dans l'intestin des insectes dépourvus de *jouvence*.**

La colonne « Gène » indique le nom du gène étudié selon FlyBase. La colonne « FlyBase ID » indique le numéro d'identification du gène sur FlyBase. La colonne « Taux » indique le niveau d'expression relatif du gène mesuré lors du séquençage d'ARN par rapport au contrôle. La colonne « qPCR » indique le taux d'expression du gène candidat mesuré par qRT-PCR à partir d'un lot d'échantillons indépendants comparé à l'expression basale au sein de la lignée contrôle (*Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T*). Les autres colonnes fournissent des informations sur la fonction du gène comme le processus biologique dans lequel il est impliqué, sa fonction moléculaire et dans quel composant cellulaire est-il présent. ND : Non Déterminé.

## 2. Résultats.

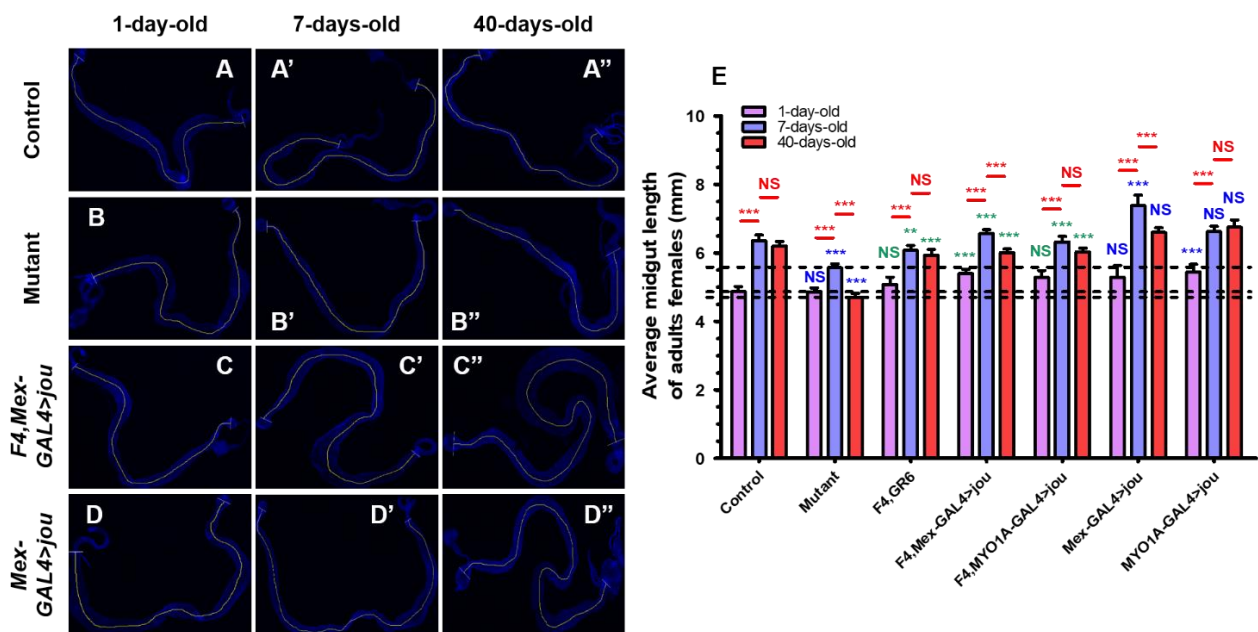
### 2.1. *jouvence* régule la taille de l'intestin de la drosophile adulte.

L'homéostasie de l'épithélium de l'intestin moyen maintenue par les CSI est essentielle pour la préservation de l'intégrité intestinale. Au cours du vieillissement et du stress, les CSI sont amenées à proliférer et à générer des EB, qui se différencieront ensuite en EC et en CEE pour remplacer les cellules endommagées ou perdues et remodeler l'intestin. Ainsi, la longueur de l'intestin peut être influencée par ces phénomènes. Nos résultats ont montré que cette perte du maintien de l'épithélium est accélérée et accentuée chez les mutants nuls pour *jouvence*. De ce fait, nous avons voulu effectuer une analyse macroscopique de certains paramètres de l'intestin.

Chez le jeune adulte, la maturation de l'intestin, c'est-à-dire l'acquisition de la taille finale et aussi la production des différents types cellulaires, nécessite en moyenne trois jours (274). De plus d'après une récente étude, les femelles adultes commencent à se nourrir en moyenne cinq heures post-éclosion (274). Ainsi, ces différentes données nous ont guidés dans la sélection de trois âges : des adultes de 1 jour qui commencent à s'alimenter, des femelles adultes de 7 jours qui présentent un intestin complet, et des mouches vieilles de 40 jours présentant des dommages dans l'homéostasie intestinale. A première vue, les intestins à ces différents

âges présentent des formes anatomiques similaires, mais des différences substantielles en termes de taille sont à noter (Fig. 51).

Pour déterminer la taille de l'intestin, nous avons mesuré la longueur de l'intestin moyen en commençant vers le milieu du proventricule (cardia) jusqu'au pylore, qui correspond à la jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur où se ramifient les tubules de Malpighi. Chez les mouches à 1 jour post-éclosion, nous avons remarqué que la taille de l'intestin de la plupart des génotypes est restée comparable ( $\approx 5$  mm) (Fig. 51A, B, C, D et E). Cependant, certaines lignées se différencient déjà avec une longueur de l'intestin considérablement plus élevée ( $\approx 5,5$  mm), lorsque *jouvence* est exprimé dans le fond génétique sauvage (*MYO1A-GAL4>UAS-jou*) ou mutant (*F4,Mex-GAL4>UAS-jou*) (Fig. 51E). Par rapport au jour 1, les intestins des mouches témoins sont apparus significativement plus long à 7 jours (Fig. 51A' et E). En effet, l'intestin a continué à croître jusqu'à atteindre sa taille définitive. Nous avons également constaté que les intestins des mutants *jouvence* étaient nettement plus courts ( $\approx 5,5$  mm) que ceux des mouches témoins ( $\approx 6,5$  mm) à 7 jours (Fig. 51B' et E), indiquant qu'il y a moins de croissance chez le mutant *F4*. De plus, la réexpression de *jouvence* dans le fond génétique de délétion avec la lignée *F4,GR6* ou avec les lignées pilote spécifiques de l'intestin, telles que *Mex-GAL4* et *MYO1A-GAL4*, a permis de sauver la longueur de l'intestin des mutants au même âge à une taille équivalente à celle des contrôles (Fig. 51C' et E). Inversement, la surexpression de *jouvence* dans le fond sauvage spécifiquement dans l'épithélium intestinal, notamment avec la lignée *Mex-GAL4*, a augmenté de manière significative la longueur de l'intestin des mouches témoins au même âge ( $\approx 7,5$  mm) (Fig. 51D' et E). En outre à 40 jours, les intestins des animaux contrôles et des autres génotypes ont plus ou moins maintenus la taille de leur intestin (Fig. 51A'', C'', D'' et E), alors que les mutants ont montré un raccourcissement significatif de la taille de leur intestin ( $\approx 4,5$  mm) par rapport à leurs homologues à 7 jours (Fig. 51B'' et E).



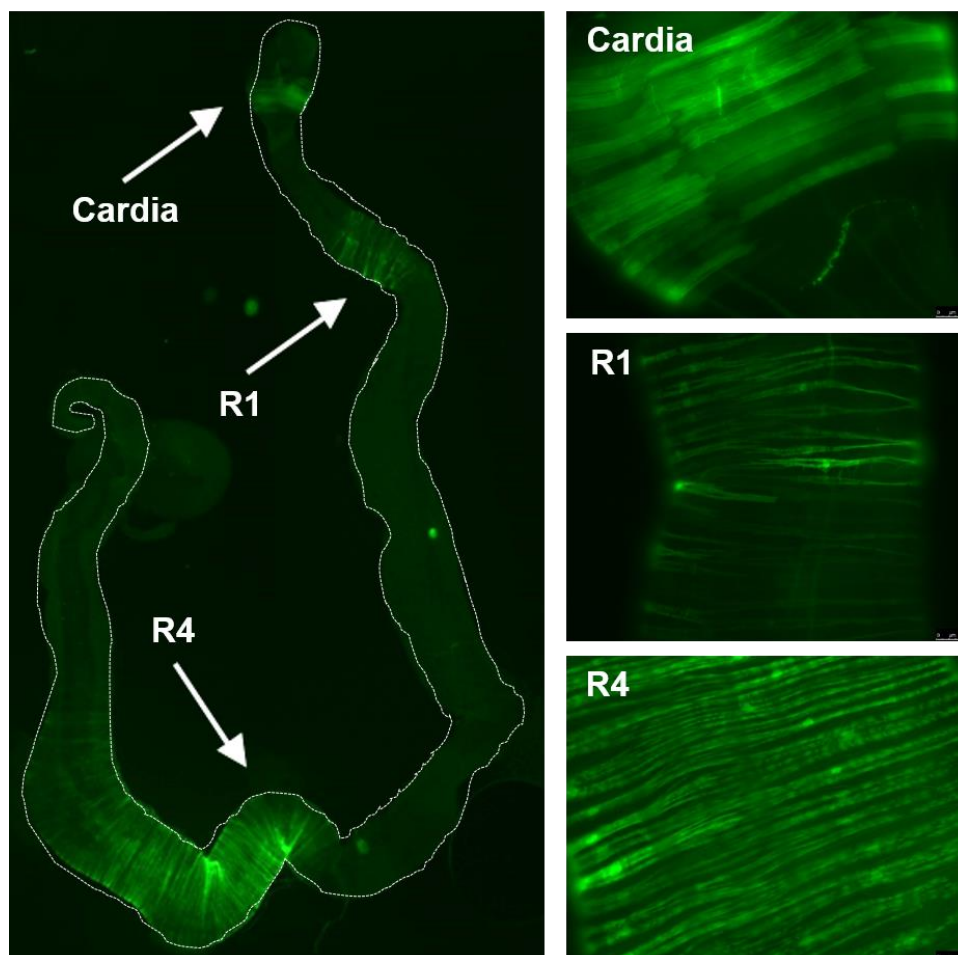
**Figure 51 – *jouvence* est impliqué dans la croissance intestinale.**

(A – D) Images représentatives d'intestins de mouches femelles de 1, 7 et 40 jour(s) des génotypes suivants : contrôle (A, A' et A''), mutant (B, B' et B''), *F4,Mex-GAL4>UAS-jou* (C, C' et C'') et *Mex-GAL4>UAS-jou* (D, D' et D''). **Bleu :**

Visualisation des noyaux (DAPI). La ligne jaune tracée le long de l'axe de l'intestin délimite le cadre de mesure allant du milieu du cardia jusqu'au pylore. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. **(E)** Détermination de la taille brute des intestins sur des mouches femelles âgées de 1 (**violet**), 7 (**bleu**) et 40 jours (**rouge**) des génotypes suivants : *CS* (contrôle) ; *F4* (mutant) ; *F4,GR6* ; *F4,Mex-GAL4>UAS-jou* ; *F4,MYO1A-GAL4>UAS-jou* ; *Mex-GAL4>UAS-jou* et *MYO1A-GAL4>UAS-jou*. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ . Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*CS*) sont affichées en **bleu**, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4*) sont affichées en **vert**. Les étoiles en **rouge** montrent les différences significatives observées pour le même génotype à des âges différents.

## 2.2. La production locale d'insuline est nécessaire pour la croissance intestinale.

Nous avons observé que la mutation de *jouvence* a provoqué une baisse significative du taux de croissance, évalué via l'allongement de l'intestin des animaux. Ainsi, nos données suggèrent fortement que *jouvence* a un rôle critique dans la régulation de la croissance intestinale. Nous avons alors cherché à identifier des signaux qui lient l'expression de *jouvence* à la croissance. Le candidat le plus intéressant était la voie IIS, dont le rôle central dans le contrôle de la croissance est largement conservé au cours de l'évolution. Chez les mouches, une partie de cet effet de l'insuline sur la croissance des organes est médiée par un groupe de neurones cérébraux spécialisés qui sécrètent des Dilp dans le système circulatoire. De ce fait, nous avons examiné si un indice plus proximal pouvait influencer ce paramètre dans l'intestin. VEENSTRA et ses collaborateurs (270) (367) ont, en effet, signalé l'expression d'un peptide de l'insuline, le Dilp3, dans les muscles viscéraux de l'intestin moyen, alors qu'une autre a montré que le Dilp3 est responsable de la croissance de l'intestin dans les premiers jours suivant l'éclosion, et plus particulièrement en rapport avec le jeûne (274). Le Dilp3 de l'intestin moyen est néanmoins limité à certaines sous-régions de fibres musculaires circulaires, plus quelques muscles longitudinaux (cardia, R1 et R4) (Fig. 52). De plus comme mentionné précédemment, les résultats issus du séquençage d'ARN ont révélé que le niveau d'expression du gène *Dilp3* était considérablement réduit chez les mutants nuls pour *jouvence* (Tabl. XIII). Nous avons ainsi décidé d'explorer plus cette piste avec le Dilp3 afin d'expliquer ces différences dans la longueur de l'intestin.



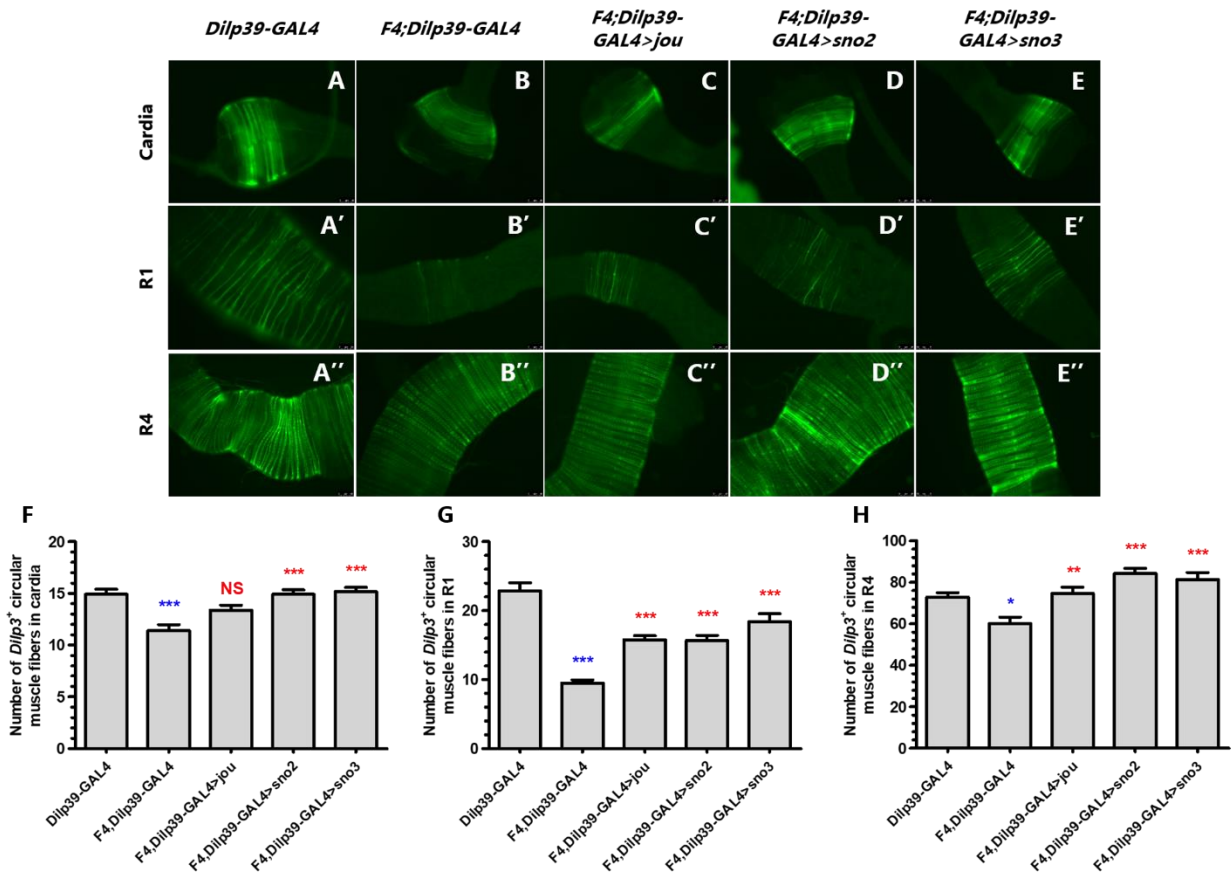
**Figure 52 – Visualisation de l’expression du gène *Dilp3* dans les muscles de l’intestin moyen.**

Expression du *Dilp3* dans les muscles viscéraux de l’intestin moyen. L’expression du gène *Dilp3* a été démontrée chez l’adulte en utilisant des mouches transgéniques avec le promoteur *Dilp3* pour conduire l’expression du GAL4 : *Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T*. Le marquage GFP a été trouvé dans les muscles circulaires du cardia et dans ceux de l’intestin moyen dans les régions R1 et R4 (vert). Quelques fibres musculaires longitudinales peuvent aussi être marquées.

### 2.2.1. L’expression du snoARN *jouvence* dans les cellules musculaires exprimant le *Dilp3* a entraîné une augmentation de la taille de l’intestin.

Pour comprendre le mécanisme par lequel la perte de *jouvence* régule négativement la croissance intestinale, nous avons analysé l’expression du *Dilp3* dans l’intestin. Pour évaluer la relation entre *jouvence* et l’insuline, nous avons utilisé des mouches transgéniques *Dilp3-GAL4* appelées *Dilp39-GAL4* dans le fond génétique désiré (sauvage ou mutant), dans lesquelles la *GFP* est exprimée sous le contrôle du promoteur *Dilp39-GAL4* pour visualiser l’expression dans le muscle (*Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T*) (9) (62). Nous avons alors compté le nombre de cellules musculaires circulaires qui exprimaient le *Dilp3* (*GFP<sup>+</sup>*) pour chaque zone de l’intestin, à savoir dans le cardia, une région de l’intestin moyen antérieur (R1) et une autre dans la partie postérieure de l’intestin moyen (R4). La quantification indique une diminution significative du nombre de fibres

musculaires exprimant *Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T* dans les différentes zones de l'intestin des mutants par rapport aux contrôles (Fig. 53A, B, F, G et H). Nous avons ensuite combiné le transgène *F4,Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T* avec la construction *UAS-jou*, et nous avons constaté aucune différence dans le nombre de muscles viscéraux marqués à la *GFP* dans le cardia (Fig. 53C, et F), mais une augmentation du nombre de fibres musculaires dans la R1 et la R4 par rapport aux mutants (Fig. 53C, G et H). En outre, nous avons cherché à étudier l'effet des deux autres snoARN présents en amont de *jouvence* dans la croissance intestinale (313). Ces deux snoARN sont également absents chez les mutants *F4*. Nous avons constaté que l'expression musculaire du *F4,Dilp39-GAL4>UAS-GFP-S65T* a été modifiée lorsque les deux autres snoARN (*UAS-sno2* et *UAS-sno3*) ont été exprimés individuellement (Fig. 53D et E) par le promoteur *Dilp39-GAL4*, notamment illustrée par une augmentation du nombre de fibres musculaires par rapport aux mutants (Fig. 53F, G et H). Nos résultats ont ainsi montré une expression élevée du *Dilp3* dans le muscle environnant chez les mouches mutantes réexprimant l'un des trois snoARN.

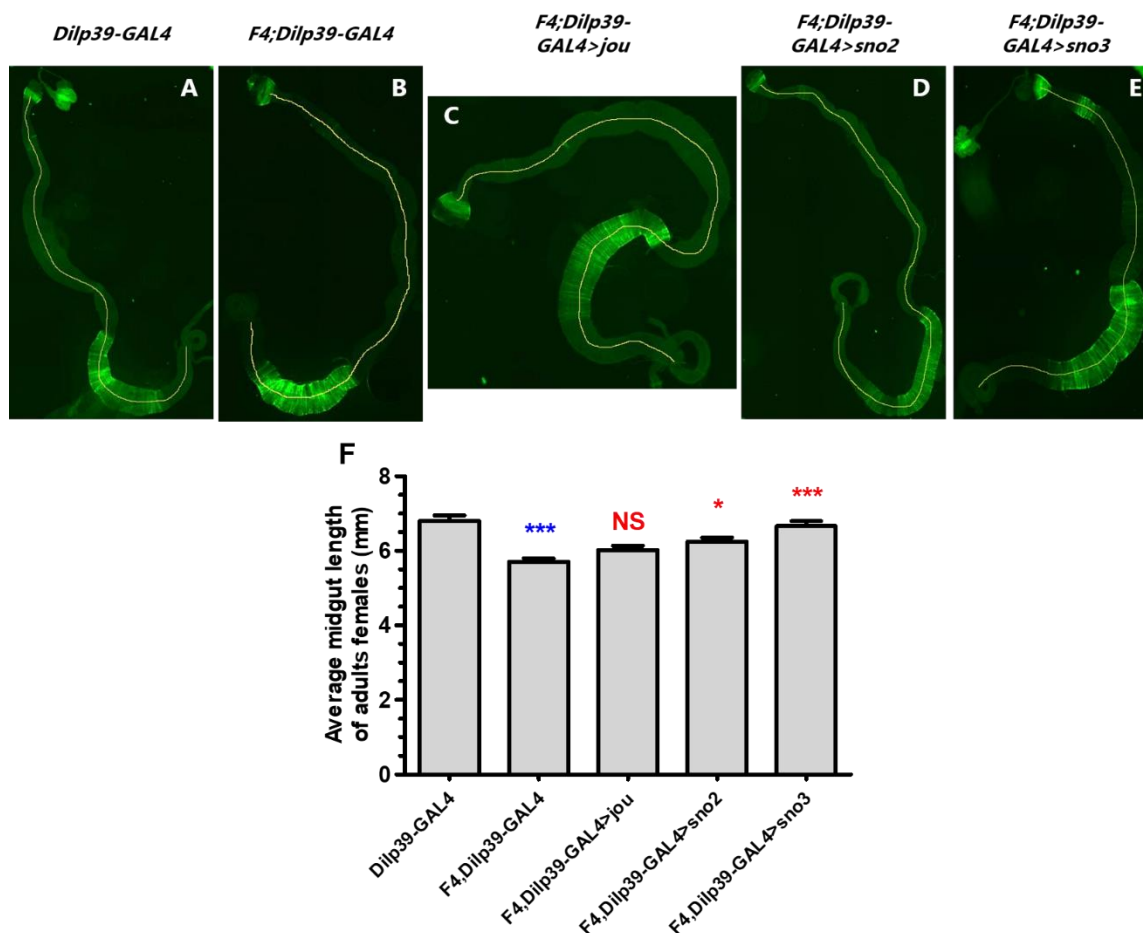


**Figure 53 – La perte des snoARN a affecté le nombre de cellules musculaires exprimant le *Dilp3* dans l'intestin.**

(A - F) Images représentatives des différentes zones exprimant le *Dilp3* (cardia, R1 et R4) d'intestins de mouches sauvages, mutantes et de mouches exprimant les différents snoARN (*jouvence*, *snoARN-2* et *snoARN-3*) en combinaison avec la *GFP* sous le contrôle de la lignée pilote *Dilp39-GAL4* dans le fond génétique de délétion. Vert : GFP (*Dilp3*). Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. (F - H) Comptage du nombre de fibres musculaires circulaires marquées à la GFP (*Dilp3*) dans l'intestin de femelles de 7 jours des différents génotypes mentionnés dans le cardia (F), la R1 (G) et la R4 (H). Les barres d'erreur représentent

l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*Dilp39-GAL4>CS*) sont affichées en **rouge**, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4,Dilp39-GAL4>F4*) sont affichées en **bleu**.

Pour tester si ce redimensionnement de l'intestin est corrélé au niveau de Dilp3, nous avons déterminé la taille relative de l'intestin des différents génotypes mentionnés ci-dessus. De manière attendue, l'épuisement local de Dilp3 a fortement réduit la longueur de l'intestin par rapport aux témoins (Fig. 54A, B et F). Ainsi, ce résultat démontre la nécessité de l'insuline pour une croissance complète de l'intestin. Cependant lorsque nous avons ré-exprimé *jouvence*, la longueur de l'intestin n'a pas évolué (Fig. 54C et F), alors qu'avec les deux autres snoARN (*sno2* et *sno3*) la taille de l'intestin des mutants a été allongée (Fig. 54D, E et F). Par conséquent, la perte de fonction des snoARN a provoqué un raccourcissement considérable de la taille de l'intestin par une réduction dans le niveau de Dilp3, mais la réexpression seule du *sno2* ou du *sno3* a permis de sauver la croissance intestinale.



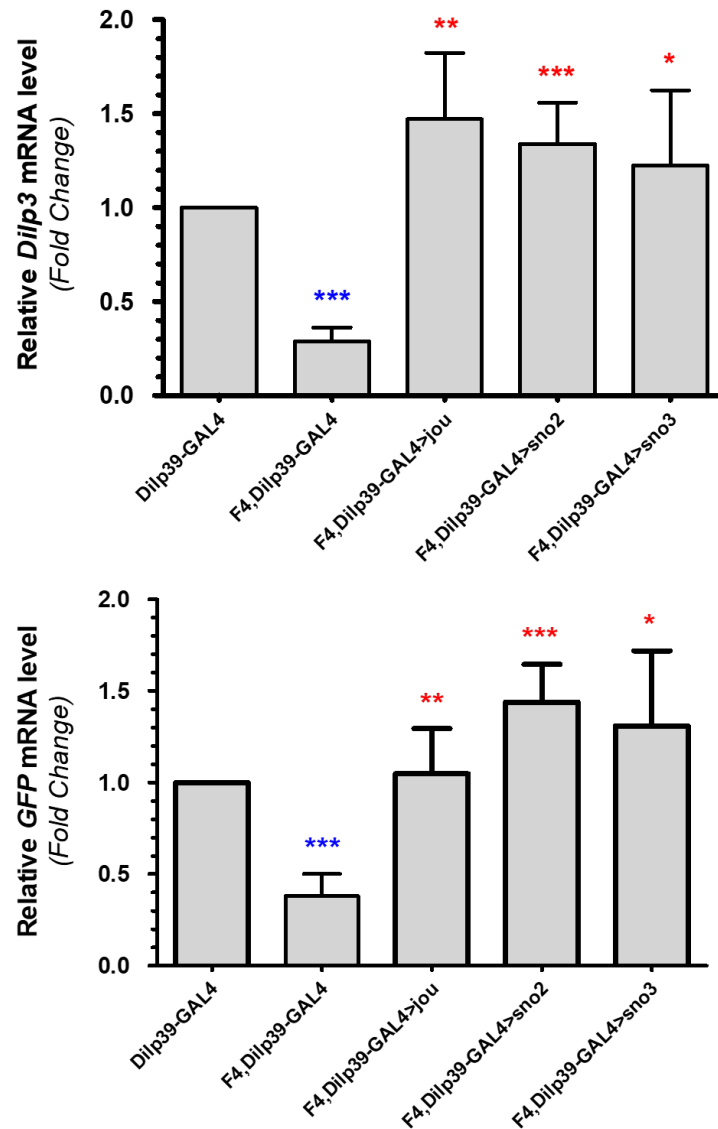
**Figure 54 – Les snoARN favorisent la croissance de l'intestin grâce à l'expression du *Dilp3*.**

(A – E) Images représentatives d'intestins entiers de mouches sauvages, mutantes et de mouches exprimant les différents snoARN (*jouvence*, *snoARN-2* et *snoARN-3*) en combinaison avec la *GFP* sous le contrôle de la *Dilp39-GAL4* dans le fond génétique de délétion. **Vert** : GFP (*Dilp3*). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. (F) Quantification de la longueur de l'intestin des

génotypes indiqués sur des femelles de 7 jours. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*Dilp39-GAL4>CS*) sont affichées en rouge, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4,Dilp39-GAL4>F4*) sont affichées en bleu.

### 2.2.2. La réduction de la taille de l'intestin chez les mutants est due à une diminution dans l'expression du *Dilp3*.

En résumé, la longueur de l'intestin des mutants est raccourcie lorsque les différents snoARN (*jouvence*, *sno2* et *sno3*) ont été supprimés par des réductions dans le nombre de fibres musculaires circulaires exprimant le *Dilp3*. Ce changement physiologique pourrait être partiellement expliqué par des changements significatifs dans les niveaux d'ARNm pour le gène codant pour le *Dilp3*. Pour interpréter pleinement ces résultats, nous avons mesuré les niveaux d'expression du *Dilp3* et de la *GFP* dans les intestins adultes disséqués des différents génotypes par PCR quantitative. Comme prévu, les intestins des mouches *F4,Dilp39-GAL4>UAS-GFP* ont montré un niveau d'expression du gène *Dilp3* d'environ 2,5 fois plus bas que celui du contrôle *Dilp39-GAL4>UAS-GFP* (Fig. 55A), de même pour la *GFP* (Fig. 55B). Cependant chez les lignées de réexpression (*F4,Dilp39-GAL4;UAS-GFP>UAS-jou*, *F4,Dilp39-GAL4;UAS-GFP>UAS-sno2* et *F4,Dilp39-GAL4;UAS-GFP>UAS-sno3*), l'expression du *Dilp3* et de la *GFP* avaient nettement augmenté dans les intestins, légèrement supérieur au niveau des mouches témoins pour la plupart (Fig. 55A et B), en corrélation avec l'augmentation ultérieure du nombre de fibres musculaires (Fig. 55F, G et H). Ainsi, nos données montrent que ces peptides d'insuline sont essentiels dans le mécanisme de croissance de l'intestin. En outre, il semblerait que les trois snoARN modulent son expression. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être répétés vu une certaine variabilité dans les données obtenues.



**Figure 55 – Confirmation par qRT-PCR en temps réel de la diminution de la quantité d'ARNm du *Dilp3* dans l'intestin.**

(A – B) 40 intestins de mouches femelles âgées de 7 jours ont été disséqués par génotype pour chaque extraction d'ARN et d'analyse qRT-PCR (n = 3). Niveaux d'expression du gène *Dilp3* (A) et de la *GFP* (B). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*Dilp39-GAL4>CS*) sont affichées en rouge, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4,Dilp39-GAL4>F4*) sont affichées en bleu.

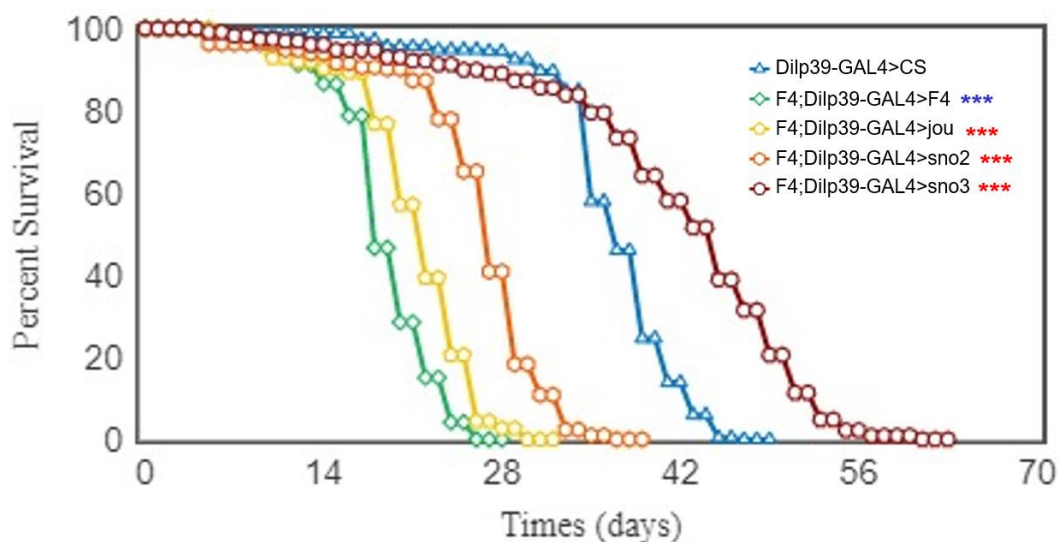
### 2.3. Importance du *Dilp3* dans la survie des mouches.

Des études antérieures ont montré que cette voie IIS est également impliqué dans le contrôle de la durée de vie des mouches (86) (131) (142) (143) (368). Lorsque nous avons examiné la longévité de ces insectes, les mutants dépourvus des trois snoARN (*F4,Dilp39-GAL4>F4*), et avec une faible expression du *Dilp3* (Tabl.



XIII) (Fig. 55A), ont montré une durée de vie significativement plus courte avec 50% de mortalité à 18 jours contre 37 jours pour les contrôles (*Dilp39-GAL4>CS*) (Tabl. SI). Plus concrètement, les mouches mutantes voient leur durée de vie diminuer de 51% par rapport aux mouches témoins (Fig. 56). Cependant, lorsque le niveau d'expression du *Dilp3* a été augmenté chez les mouches mutantes adultes par la réexpression de *jouvence* ou du *sno2* ou du *sno3* (Fig. 56), une élongation de la durée de vie a été observée par rapport aux mutants (Fig. 56). Plus en détail, une légère augmentation de 22% est observée avec la réexpression de *jouvence* (*F4,Dilp39-GAL4>UAS-jou*) avec 50% de mortalité à 22 jours, alors que les mouches transgéniques *F4,Dilp39-GAL4>UAS-sno2* (50% de mortalité à 27 jours) et *F4,Dilp39-GAL4>UAS-sno3* (50% de mortalité à 45 jours) voient leur durée de vie augmenter de 1,5 fois et 2,5 fois, respectivement (Fig. 56) (Tabl. SI). Toutefois, il faut tout de même noter que les mouches *F4,Dilp39-GAL4>UAS-jou* et *F4,Dilp39-GAL4>UAS-sno2* présentent une durée de vie inférieure à celles des mouches contrôles (*Dilp39-GAL4>CS*) (Fig. 56).

Dans leur ensemble, nos données ont montré que d'importants changements physiologiques chez ces mouches mutantes ont été découverts, comme une réduction de la croissance intestinale, un raccourcissement de la durée de vie et une hyperprolifération des CSI. De plus, ces résultats suggèrent aussi qu'un niveau d'expression équilibré du *Dilp3* est essentiel pour la santé à long terme de l'animal.



**Figure 56 – L'expression des snoARN dans les fibres musculaires de l'intestin exprimant le *Dilp3* améliore la durée de vie des mouches.**

Courbes de survie des génotypes suivants : *Dilp39-GAL4>CS* (n = 252 femelles), *F4,Dilp39-GAL4>F4* (n = 193 femelles), *F4,Dilp39-GAL4>UAS-jou* (n = 112 femelles), *F4,Dilp39-GAL4>UAS-sno2* (n = 213 femelles) et *F4,Dilp39-GAL4>UAS-sno3* (n = 229 femelles). Les différences significatives entre les lignées et leurs contrôles respectifs ont été déterminées en utilisant le test du Log-rank avec le logiciel d'analyse OASIS (\*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001). Des statistiques complètes, comprenant le nombre d'individus analysés, médiane, moyenne et durée de vie maximale pour toutes les expériences, sont présentées dans le tableau SI. Les étoiles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le contrôle (*Dilp39-GAL4>CS*) sont affichées en rouge, tandis que celles qui mettent en évidence les comparaisons significatives avec le mutant (*F4,Dilp39-GAL4>F4*) sont affichées en bleu.

## 3. Discussion

### 3.1. Redimensionnement de l'intestin des mouches déficientes pour *jouvence*.

Le système digestif larvaire mis en place pendant l'embryogenèse dégénère en grande partie pour être reconstitué grâce à l'action de précurseurs nommés AMP (Adult Midgut Precursor) pendant la métamorphose. Ces groupes de cellules vont proliférer par divisions symétriques et ensuite se différencier par divisions asymétriques conduisant à la reformation d'un intestin (325). Chez le jeune adulte, la maturation, c'est-à-dire l'acquisition de la taille finale et la production des différents types cellulaires de ce nouvel organe, nécessite trois jours (274). De plus, des études antérieures ont montré que la taille finale d'un organe résulte d'une interaction de facteurs génétiques et environnementaux, par exemple les taux de croissance intrinsèque et la disponibilité alimentaire (274). Alors que la quantité de nourriture disponible pour un organisme en croissance est un déterminant évident de la taille finale, ce n'est clairement pas le seul déterminant. La taille d'un tissu est également contrôlée par des facteurs génétiques. Pour tester si la mutation de *jouvence* affecte la morphologie de l'intestin de la drosophile, nous avons mesuré les effets de cette mutation sur la longueur de l'intestin moyen des mouches. Alors qu'à un jour post-éclosion tous les intestins avaient la même longueur, les mouches mutantes âgées de 7 jours ont des intestins plus courts que les contrôles. Il est alors supposé qu'une plus petite taille de tissu peut résulter d'un plus petit nombre de cellules, ou d'une taille de cellule réduite, ou d'une combinaison des deux. De ce fait, nous pouvons imaginer que la morphogenèse cellulaire aberrante observée chez les mutants a des répercussions sur la morphologie du tissu dans son ensemble. Or, les mutants ont plus de cellules mais un intestin court. De plus, nous avons montré que les noyaux des EC sont plus petits que ceux des contrôles. Ainsi, ce redimensionnement adaptatif est probablement dû à la diminution de la taille des cellules plutôt que du nombre de cellules. La croissance peut se produire par agrandissement de la cellule. En effet, des études ont montré que la modification de la longueur du cycle cellulaire n'affecte pas directement la croissance globale des organes, ce qui indique que la régulation de la croissance cellulaire peut se produire indépendamment du contrôle du cycle cellulaire (358). Encore plus surprenant, les intestins des mouches mutantes vieilles sont plus petits que ceux âgés de 7 jours. La contraction des muscles viscéraux pourrait expliquer ce raccourcissement significatif de l'intestin moyen chez les mutants âgés de 40 jours. En effet avec l'âge, les muscles ont tendance à perdre en élasticité et à se relâcher. Il serait intéressant d'évaluer l'état des muscles viscéraux chez ces individus avec un marquage à la phalloïdine.

### 3.2. Le contrôle de la croissance par la voie IIS est conservé au cours de l'évolution.

Bien qu'une variété de mutations chez la drosophile provoque des changements dans la taille du corps et des organes, une voie en particulier, la voie du récepteur de l'insuline, a attiré une attention considérable car les défauts de cette voie provoquent des effets évidents sur la taille de la mouche et des tissus. La sous-activation de la voie génère de petites mouches, tandis que la suractivation génère de grandes mouches (85) (86) (142). En effet, la voie IIS a été particulièrement étudiée pour son implication dans le contrôle du taux de croissance globale, car il orchestre la croissance cellulaire, le cycle cellulaire et la survie cellulaire. Chez les invertébrés, l'IIS est fortement conservée et les Dilp portent à la fois les fonctions métaboliques de l'insuline et les fonctions de croissance des IGF. L'analyse transcriptomique a révélé que le *Dilp3*, exprimé dans les muscles viscéraux circulaires de certaines régions de l'intestin, est fortement régulé à la baisse chez les mouches mutantes. Nos résultats, bien qu'encore préliminaires, montrent que lorsque nous réexprimons le *sno2* ou le *sno3* spécifiquement dans ces cellules musculaires, la taille de l'intestin est restaurée, tandis qu'avec le snoARN *jouvence* aucun sauvetage n'est observé. Ainsi, les *sno2* et *sno3* favoriseraient la croissance de l'intestin au travers la voie de signalisation de l'insuline/IGF, et plus particulièrement en régulant l'expression du Dilp3 local. Cependant, la principale lacune de notre étude est la compréhension du mécanisme par lequel le Dilp3 agirait sur la croissance de l'intestin : le Dilp3 influencerait directement la croissance cellulaire en agissant notamment sur la taille des cellules, ou induirait d'autres signaux nécessaires dans la détermination de la taille finale du tissu ? Par exemple, une étude a montré que *chico*, un homologue des IRS1–4 des vertébrés chez la drosophile, joue un rôle essentiel dans le contrôle de la taille et de la croissance des cellules. Les animaux mutants pour *chico* font moins de la moitié de la taille des mouches de type sauvage et forment des organes de petite taille en raison de la taille réduite des cellules (358). En revanche, une autre étude a établi que le Dilp3 intestinal stimule la prolifération des CSI. Dans notre cas, les mutants *F4* ont des niveaux faibles de Dilp3 mais une hyperprolifération intestinale. En outre, notre étude a démontré que les différences physiologiques entre les mouches peuvent expliquer la courte durée de vie des mutants. Ces données ne sont pas si étonnantes vu le rôle conservé de la voie IIS dans la longévité.

Les données présentées ici suggèrent que les *sno2* et *sno3* contrôlent la croissance de l'intestin, à l'instar de *jouvence*, et que la régulation de sa taille est exercée par le Dilp3, ce qui fait de cette voie une bonne cible pour moduler la taille des organes au cours de l'évolution. En effet, le séquençage d'ARN a montré qu'une réduction de la signalisation de l'insuline par une perte locale de la fonction du *Dilp3* dans l'intestin réduit la taille de ce dernier suite à la perte des trois snoARN. À l'inverse, la réexpression spécifique du *sno2* ou du *sno3* dans les cellules *Dilp3<sup>+</sup>* est suffisante pour augmenter la taille du tissu. Ainsi, la modulation génétiquement contrôlée des niveaux du Dilp3 dans l'intestin a contribué à la croissance de l'organe. De plus, cette étude

révèle l'existence d'interactions complexes entre la voie de signalisation de l'insuline et les snoARN pour la détermination de la taille finale de l'intestin de l'organisme.

# **Chapitre 5 : Rôle de *jouvence* dans l'organisation structurale des particules ribonucléoprotéiques (RNP) de type H/ACA.**

## **1. Introduction.**

Selon une étude bio-informatique et basée sur sa structure primaire, *jouvence* est un snoARN à boîte H/ACA. La majorité des snoARN de type H/ACA servent de guide pour l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine (218) (369). En effet, comme prédit par l'étude bio-informatique effectuée par HUANG (323), nos expérimentations ont montré que *jouvence* est capable de pseudouridyle les ARNr 18S à la position 1 425 et 28S à la position 1 153 (313). Afin d'effectuer cette modification, les snoARN s'associent à un ensemble de protéines spécifiques et conservées au cours de l'évolution pour former une particule RNP stable et fonctionnelle. Quatre protéines forment le cœur de la particule H/ACA, incluant la dyskérine (Cbf5p chez la levure et les archées ou minifly chez la drosophile), GAR1, NHP2 et NOP10 (Fig. 17A) (369). La dyskérine/Cbf5p/minifly est le composant catalytique du complexe RNP H/ACA car elle agit comme une pseudouridine synthase, dirigeant l'isomérisation d'uridine spécifique en pseudouridine (Fig. 17D) (370) (371). L'assemblage avec les protéines est nécessaire pour la localisation nucléolaire et la stabilité des snoARN. De plus, les protéines dyskérine, NHP2 et NOP10 forment un trimère de base qui se lie directement aux snoARN H/ACA. Les trois protéines sont interdépendantes les unes des autres pour la stabilité des snoARN et régulent également la stabilité des ARN cibles liés (372). GAR1 se lie uniquement à la pseudouridine synthase et est nécessaire au bon fonctionnement des RNP H/ACA, mais son absence n'a aucun effet sur la stabilité des snoARN (373). Cependant après la liaison du GAR1, les RNP à boîtes H/ACA, complètement arrivées à maturité, passent du noyau au nucléole et aux corps de Cajal qui sont les sites où ces complexes sont censés fonctionner principalement. Des expériences chez la levure ont montré que la perte de fonction des protéines cœur H/ACA du complexe trimérique (Cbf5p/dyskérine/minifly, NHP2 et NOP10) réduit la stabilité des snoARN H/ACA et sont aussi essentielles à la viabilité des cellules. Étant donné les multiples fonctions essentielles que joue ce snoARN hautement conservé, il était crucial de caractériser les effets des composants protéiques des RNP à boîtes H/ACA sur l'expression de *jouvence* dans l'intestin.

## 2. Résultats.

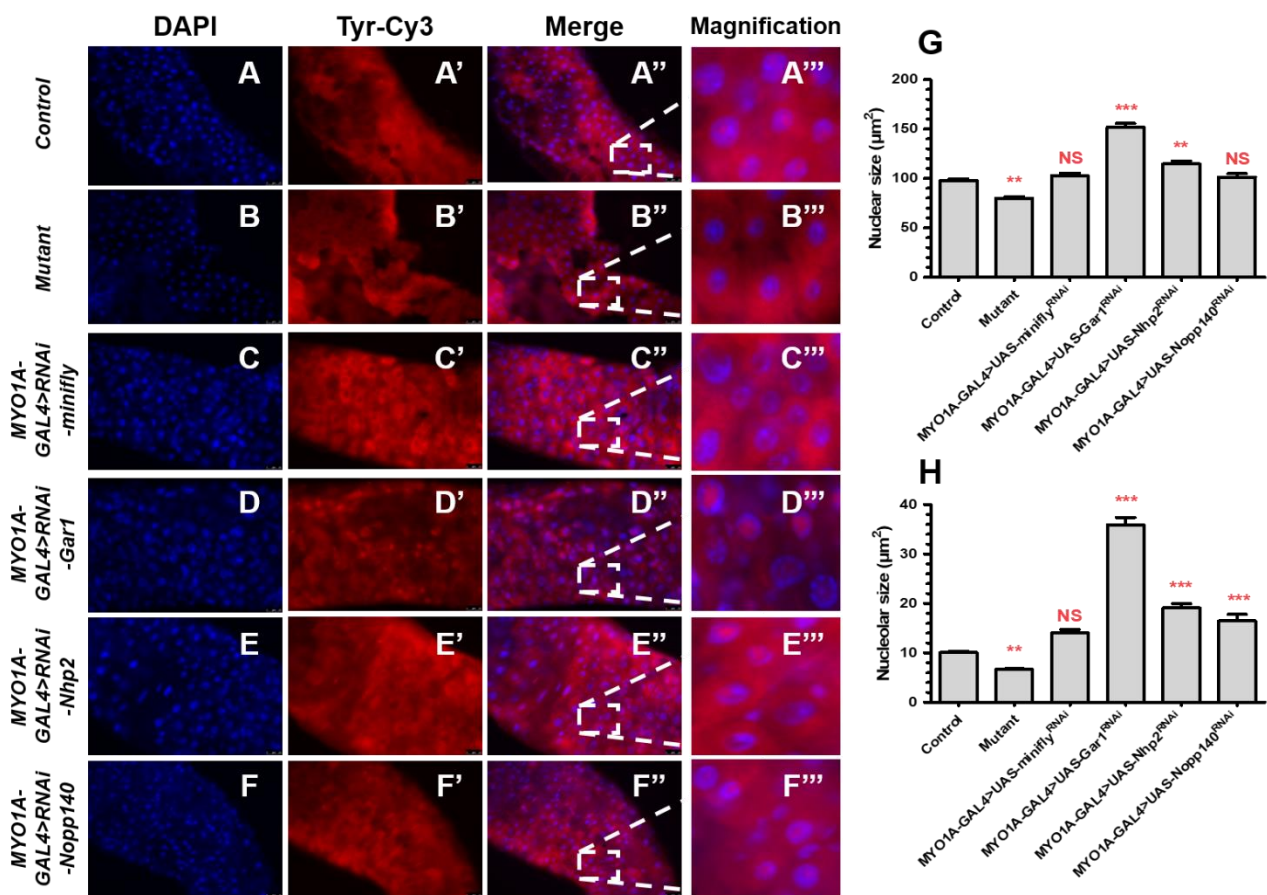
### 2.1. Conséquences de la déplétion des ARNm des protéines associées aux snoARN par l'ARNi.

Dans cette étude, nous avons analysé les effets de la déplétion des ARNm correspondants aux protéines constitutives du complexe RNP à boîtes H/ACA sur l'expression de *jouvence* par hybridation *in situ* dans l'intestin. Nous avons donc utilisé des ARNi spécifiques pour couper les ARNm cibles afin de diminuer ou bloquer l'expression des protéines individuelles associées aux complexes RNP de type H/ACA.

Alors que la grande majorité des EC des animaux témoins présentait un marquage nucléolaire clairement évident attestant de la présence de *jouvence* (Fig. 57A), les cellules polyploïdes des mutants étaient déficientes pour *jouvence* (Fig. 57B). De plus, la perte du snoARN a entraîné des perturbations morphologiques des EC chez l'adulte. En effet, la taille des noyaux et des nucléoles des cellules épithéliales de l'intestin ont significativement réduit en raison de la perte de *jouvence* par rapport aux contrôles (Fig. 57G et H). Les nucléoles ne sont pas facilement discernables et quantifiables dus à l'absence de marquage dans l'intestin des mutants. Le KD de *minifly*, qui code pour la pseudouridylate synthase, n'a montré aucune expression du snoARN lorsqu'elle a été croisée avec *MYO1A-GAL4* (*MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-minifly*) (Fig. 57C), alors que les noyaux et les nucléoles sont restés morphologiquement normaux (Fig. 57G et H). Comme pour les mutants nuls pour *jouvence*, les nucléoles n'étaient pas facilement identifiables dans ces noyaux. De manière inattendue, des effets cellulaires forts ont été observés avec la protéine GAR1. L'expression réduite de GAR1 dans les EC dans le fond génétique sauvage (*MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Gar1*) provoque un gonflement et une désorganisation des nucléoles. Le snoARN s'est retrouvé dans le nucléole et le nucléoplasme (Fig. 57D). Aucune des autres protéines n'a présenté un changement de localisation similaire. L'expression médiée par l'ARNi de GAR1 entraîne une augmentation des noyaux et des nucléoles de plus grandes tailles pour les EC (Fig. 57G et H). En revanche, les mouches *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Nhp2* ont montré un marquage irrégulier de *jouvence* dans les EC par rapport aux contrôles. La plupart des nucléoles sont apparus perturbés avec des noyaux ne montrant aucun marquage (Fig. 57E). De plus, l'examen de leur intestin moyen a montré des nucléoles hypertrophiés (Fig. 57H), alors que la structure nucléaire semblait assez normale (Fig. 57G). Pour la quatrième protéine, NOP10, nous n'avons pas trouvé de lignée transgénique correspondante. En contrepartie, nous avons opté pour l'*UAS-RNAi-Nopp140*. Le gène *Nopp140* code pour une phosphoprotéine nucléolaire, principalement localisée dans le composant fibrillaire dense des nucléoles ainsi que dans les corps de Cajal extra-nucléolaires. Elle fonctionne comme un chaperon dans l'assemblage des snoRNP dans les corps de Cajal, dans leur transit vers les nucléoles, et interagit également avec l'ARN polymérase I pour réguler la transcription de l'ARNr (374) (375). Une autre étude a aussi montré que NOPP140 fait la navette entre le noyau et le

cytoplasme, peut-être pour faciliter l'importation de facteurs d'assemblage des ribosomes nucléolaires ou l'exportation des produits nucléolaires (376). Les hybridations *in situ* ont révélé que les noyaux et les nucléoles des EC semblaient normaux, et *jouvence* étant correctement localisé dans les nucléoles (Fig. 57F). L'expression ciblée de l'*UAS-RNAi-Nopp140* dans l'épithélium intestinal (*MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Nopp140*) n'a entraîné aucune modification dans la morphologie nucléaire des EC (Fig. 57G). Alors que *jouvence* est resté à l'intérieur du nucléole, nous avons cependant observé une augmentation dans la taille des nucléoles (Fig. 57H).

Nous concluons que l'extinction des ARNm, et par extension de leurs protéines respectives, perturbe l'intégrité cellulaire, surtout avec GAR1. De plus, nos résultats montrent que minify est essentielle dans la stabilité du snoARN.



**Figure 57 – La diminution des ARNm, et conséquemment de leurs protéines, des particules RNP affecte la structure nucléaire et nucléolaire des EC.**

(A – F) Représentation des intestins des génotypes suivants sur des femelles âgées de 7 à 10 jours : contrôle *CS* (A), mutant *F4* (B), *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-minify* (C), *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Gar1* (D), *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Nhp2* (E) et *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-Nopp140* (F). **Bleu** : Visualisation des noyaux (DAPI) ; **Rouge** : Sonde anti-sens de *jouvence* (Tyr-Cy3). Barre d'échelle : 25 µm. (G – H) Quantification des paramètres cellulaires. (G) La taille des noyaux des EC (µm<sup>2</sup>) a été mesurée chez les différents génotypes. (H) La taille du nucléole des EC (µm<sup>2</sup>) a été définie pour les différentes lignées testées. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type (S.E.M.), et la significativité statistique a été déterminée par un test ANOVA unidirectionnel avec correction de Bonferroni : \*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001.

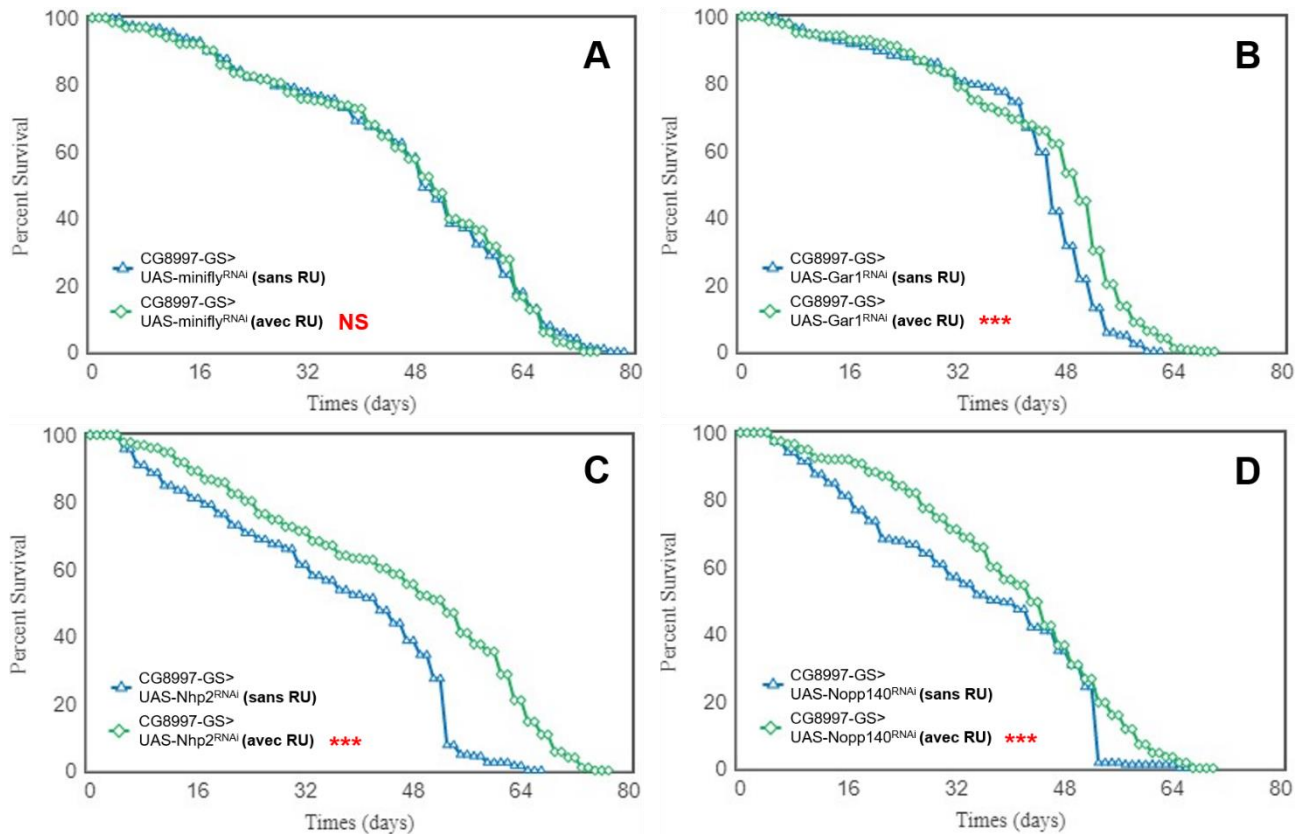
## 2.2. La diminution ou l'absence des protéines du RNP à boîtes H/ACA favorise l'extension de la durée de vie.

Vu le rôle déterminant de *jouvence* dans la longévité, nous avons voulu déterminer la durée de vie de ces mouches. Pour cela, nous avons utilisé une lignée pilote spécifique de l'intestin, le *CG8997-GS* inducible au RU486, pour exprimer les différents transgènes *UAS-RNAi* ciblant les protéines cœur du complexe RNP H/ACA uniquement durant l'âge adulte.

Etonnamment, la déplétion médiée par un ARNi des protéines GAR1, NHP2 et NOPP140 dans l'épithélium intestin a permis d'étendre la durée de vie des mouches par rapport aux individus contrôles. En effet, 50% des mouches *CG8997-GS>UAS-RNAi-Gar1* induites au RU486 vivent jusqu'à 50 jours contre 46 jours pour leurs contrôles génétiques (Fig. 58B) (Tabl. SI). Concernant les individus *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nhp2*, les mouches induites au RU486 ont une durée de vie moyenne de 53 jours, tandis que leurs contrôles non-induits ne survivent pas au-delà de 53 jours avec 50% de mortalité à 43 jours post-éclosion (Fig. 58C) (Tabl. SI). Le même constat est observé pour les *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nopp140* induites au RU486 avec 50% de mortalité à 43 jours contre 39 jours pour les mouches non-induites (Fig. 58D) (Tabl. SI). En résumé, les mouches *CG8997-GS>UAS-RNAi-Gar1*, *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nhp2* et *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nopp140* voient leur durée de vie augmenter de 9%, 23% et 10%, respectivement (Fig. 58B, C et D). Cependant, la mise en silence de *minifly* n'a eu aucun effet sur la longévité des mouches. Les animaux *CG8997-GS>UAS-RNAi-minifly* induites au RU486 ne vivent pas aussi longtemps que leurs contrôles (Fig. 58A) (Tabl. SI).

Ces résultats démontrent que le KD de l'expression de certaines protéines constitutives du complexe RNP H/ACA peut prolonger la durée de vie des mouches.





**Figure 58 - Effets du knock-down des composants du RNP médié par l'ARNi sur la longévité.**

(A) Longévité des mouches transgéniques *CG8997-GS>UAS-RNAi-minifly* induites au RU486 (n = 206 femelles) comparée à leurs contrôles non-induites (n = 230 femelles). (B) Courbes de survie en fonction de l'âge déterminées chez des mouches transgéniques *CG8997-GS>UAS-RNAi-Gar1* induites au RU486 (n = 229 femelles) et de leurs contrôles génétiques non-induites (n = 232 femelles). (C) Analyse de la survie des mouches femelles transgéniques *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nhp2* induites au RU486 (n = 234 femelles) par rapport aux mouches contrôles non-induites (n = 212 femelles). (D) Longévités des mouches *CG8997-GS>UAS-RNAi-Nopp140* induites au RU486 (n = 240 femelles) versus leurs contrôles non-induites (n = 186 femelles). Les différences significatives entre les lignées et leurs contrôles respectifs ont été déterminées en utilisant le test du Log-rank avec le logiciel d'analyse OASIS (\*p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001). Des statistiques complètes, comprenant le nombre d'individus analysés, médiane, moyenne et durée de vie maximale pour toutes les expériences, sont présentées dans le tableau SI.

### 3. Discussion

Les snoARN de type H/ACA, dont *jouvence* est membre, sont spécifiquement associés à quatre composants protéiques essentiels pour former les petites particules nucléolaires de RNP (snoRNP), soit minifly, GAR1, NOP10 et NHP2 chez la drosophile, afin de remplir leur fonction de pseudouridylation des pré-ARNr. *minifly* code une pseudouridine synthase qui joue un rôle central dans la production de l'ARNr et dans l'activité de pseudouridylation, dont les homologues eucaryotes connus sont Cfb5p chez la levure, NAP57 chez les mammifères et la dyskérine (DKC) chez l'Homme, et dont la perte est responsable de la dyskératose congénitale (371). Dans notre étude, nous avons montré que la perte de *minifly* par l'utilisation d'un ARNi a conduit à une

perte complète de *jouvence* dans les EC. *Nhp2* code pour une protéine nucléolaire également nécessaire à la synthèse d'ARNr, ainsi qu'aux réactions de pseudouridylation (377). Les mouches *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-NHP2* ont montré une expression réduite de *jouvence* dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ces deux phénotypes sont probablement une conséquence directe de l'instabilité des snoARN H/ACA observée dans les cellules privées de NHP2 ou de *minifly*. Nos résultats suggèrent que NHP2 et *minifly* constituent le noyau des snoRNP H/ACA. Ainsi, nous pouvons supposer que les cellules dépourvues de NHP2 ou de *minifly* sont altérées dans le mécanisme de pseudouridylation de l'ARNr. La perte de ces protéines pourrait alors entraîner la perte des multiples fonctions nucléolaires (synthèse, maturation et modification de l'ARNr).

Contrairement aux autres protéines de base, GAR1 est nécessaire dans la maturation, la stabilité structurale du snoARN H/ACA, ainsi que dans son accumulation dans le nucléole. En outre, GAR1 facilite le chargement de l'ARN substrat, son placement efficace et la libération de l'ARN modifié (373). Les génotypes exprimant l'*UAS-RNAi-Gar1* dans l'épithélium intestinal ont montré un gonflement et une désorganisation du nucléole avec un marquage de *jouvence* plus diffus. Nous supposons que ce phénotype est dû au fait que cette protéine s'associe plus tard dans le processus de maturation des snoRNP à boîtes H/ACA. En effet, des études ont montré que GAR1, après que la particule en voie de maturation ait quitté le site de transcription pour les corps de Cajal ou le nucléole, vient se fixer sur le complexe protéique (237). Ainsi, la perte de GAR1 a entraîné une délocalisation de *jouvence* dans le nucléoplasme au lieu du nucléole. Enfin, NOPP140 ne fait pas partie de la structure officielle des snoRNP H/ACA. Il s'agit d'une protéine résidente à la fois du nucléole et des corps Cajal, et qui sert de lien fonctionnel entre ces deux organites nucléaires. En effet, des études ont établi que NOPP140 chaperonne le transport des snoRNP entre le nucléole et les corps de Cajal (374). La perte de NOPP140 n'a pas montré de déformations majeures dans la structure nucléolaire des EC. En effet, les nucléoles des cellules polyploïdes semblaient normaux, mise à part une augmentation de la taille du nucléole.

Etonnamment, la perte de GAR1, NHP2 et NOPP140 dans l'intestin a conduit à une extension de la durée vie, alors que les animaux *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-minifly* n'ont montré aucune différence par rapport aux WT. Une hypothèse à ces phénomènes pourrait être attribuée à la taille des nucléoles. En effet, une étude a suggéré que la taille des nucléoles est un marqueur hautement prédictif de la longévité : les petits nucléoles seraient liés à un prolongement de la longévité et à une amélioration de la santé métabolique (378). Or dans notre étude, les animaux à longue durée de vie présentent de plus gros nucléoles comparés aux contrôles, bien que ces données restent préliminaires. En effet, nos résultats vont dans le sens contraire de l'étude. Par exemple, les *MYO1A-GAL4>UAS-RNAi-GAR1* ont des nucléoles élargis mais ont une durée de vie prolongée. De même, les mutants *F4* avec une durée de vie réduite ont des nucléoles de petite taille. De plus, il a été dit que la taille des nucléoles est en corrélation avec la synthèse d'ARNr (378). Finalement, rappelons que ces résultats préliminaires proviennent de l'expression d'un ARNi, et donc probablement que l'ARNm n'est pas complètement dégradé, ce qui peut conduire à un phénotype atypique. Bref, de toute évidence, les mécanismes qui expliqueraient cet effet sur la longévité restent à être élucidés.

# DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Récemment, un nouveau snoARN, nommé *jouvence*, a été identifié et caractérisé moléculairement dans les cellules nourricières des ovocytes et dans les cellules épithéliales de l'intestin chez la drosophile. Nous avons révélé que sa délétion entraîne un raccourcissement de la durée de vie, des défauts métaboliques, ainsi qu'une hyperplasie intestinale accrue. Cependant, son mécanisme moléculaire sous-jacent n'a pas été clairement élucidé. Le snoARN *jouvence* appartient à la classe H/ACA, c'est-à-dire que sa structure primaire comprend une boîte H/ACA, alors que sa structure secondaire se présente sous forme de double épingle à cheveux. Il serait donc impliqué dans la pseudouridylation, c'est-à-dire dans l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine ( $\psi$ ), lors de la maturation des ARNr, et régulerait ainsi la synthèse protéique de certains gènes (218). En effet, nous avons confirmé que les segments nucléotidiques de la poche de pseudouridylation du snoARN *jouvence* s'associent à des séquences complémentaires spécifiques de pré-ARNr pour la génération d'ARNr 18S et 28S, comme cela a été prédit bioinformatiquement (323). Or, cette fonction, bien conservée chez les eucaryotes supérieurs, est abolie chez les mouches dépourvues de *jouvence* (313). Dans la plupart des cas, les résidus de pseudouridine sont situés dans des régions conservées et fonctionnellement importantes de l'ARNr (le centre de décodage et le centre de la peptidyltransférase), et influencent ainsi la fidélité à la traduction, la reconnaissance des codons stop et les interactions ribosome-ligand. Nous supposons alors que les effets observés chez les mutants délétés pour *jouvence* (*F4*) sont probablement une conséquence d'une pseudouridylation défectueuse de la snoRNP *jouvence* et d'un dysfonctionnement ribosomique. Cela peut avoir des effets profonds sur la capacité du ribosome à traduire l'ARNm de manière précise et efficace. En effet, la perte du snoARN *jouvence* a pu affecter les différents processus cellulaires indirectement, en perturbant la formation des ribosomes et ainsi contrôler/modifier les quantités de protéines via l'efficacité de la traduction. Pour rechercher s'il y a des défauts dans le processus de traduction des ARNm à la suite de la perte de la fonction de *jouvence*, nous pouvons envisager d'effectuer un profilage ribosomique. Cette technique permet de cartographier très précisément la position des ribosomes sur l'ensemble des ARNm en cours de traduction dans la cellule, donc d'avoir des vues détaillées sur le mécanisme de la synthèse des protéines. Il permet aussi de fournir des informations sur l'identité et la quantité de protéines produites par les cellules (379). Bien que nous ayons effectué un dosage protéique par la méthode Bradford et qu'aucune différence n'a été constatée chez les mutants (Fig. 42B), cette méthode sera plus précise quant à l'impact de l'absence de pseudouridylation des ARNr 18S et 28S sur la stabilité des ribosomes et l'efficacité de la traduction, donc sur la synthèse des protéines. Une étude a déjà montré que l'absence de modifications de la pseudouridine sur l'ARNr chez les eucaryotes n'est pas compatible avec la vie. En effet, des mutations dans le gène *DKC1* codant pour la dyskérine (la pseudouridine synthase), une protéine nucléolaire impliquée dans le traitement de l'ARNr et associée au complexe de télomérase, entraînent l'apparition de la dyskératose congénitale, un syndrome d'insuffisance médullaire héréditaire associé à une susceptibilité accrue au cancer. Les animaux porteurs de la

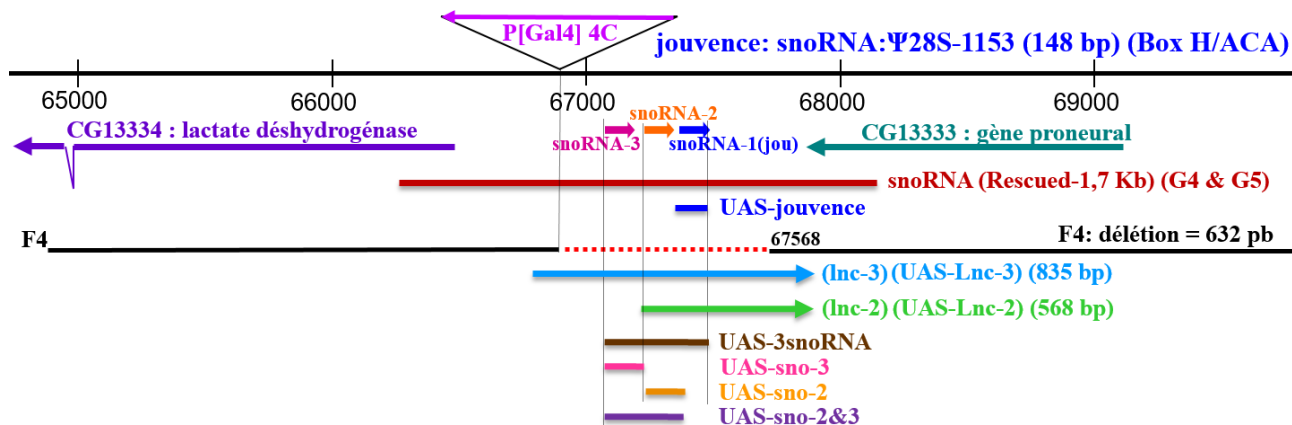
délétion décèdent rapidement et présentent une dégénérescence tissulaire (380).

Une hypothèse alternative serait que le snoARN *jouvence* puisse intervenir en dehors de la biogenèse des ribosomes, expliquant en partie les multiples effets observés. Il est de plus en plus reconnu que des snoRNP canoniques et non-canoniques existent dans les cellules, et qu'un même snoARN, considéré comme canonique, peut s'assembler en différents complexes protéiques pour des fonctions distinctes (225). Nous avons alors supposé que le snoARN à boîtes H/ACA *jouvence*, connu pour présenter une complémentarité avec les cibles d'ARNr 18S et 28S, peuvent également isomériser d'autres résidus d'uridine sur des substrats d'ARN non-canoniques, incluant par exemple les ARNm. Autrefois, les ARNm n'étaient pas connus pour contenir de la pseudouridine, mais des études récentes ont démontré que la pseudouridylation peut considérablement affecter la fonction de l'ARNm. Elle peut notamment modifier le code génétique en facilitant l'appariement de bases non-canoniques dans le centre de décodage des ribosomes. Par exemple, une étude a révélé qu'un snoARN à boîtes H/ACA peut guider la pseudouridylation des codons stop UAA, UGA et UAG (381). Une conséquence du changement de spécificité des codons médié par la pseudouridine est la diversité du protéome : en pseudouridylant des codons spécifiques, plusieurs protéines pourraient être produites à partir d'un seul ARNm (gène), illustrant la régulation génique au niveau de la modification de l'ARN. En effet, il est clair que la pseudouridylation de l'ARNm a la capacité de modifier post-transcriptionnellement le code génétique et de diversifier considérablement le protéome humain. Nous pouvons alors faire l'hypothèse que *jouvence* pourrait exercer ses effets sur un ou plusieurs autres cibles d'ARNm par le biais d'une complémentarité ARN-ARN. Il est possible que *jouvence* utilise son élément anti-sens hautement conservé pour une telle fonction. Des études ultérieures seront nécessaires afin d'identifier ces cibles ARN putatives. Une autre possibilité serait que le snoARN *jouvence* inhibe l'épissage des introns de certains gènes, peut-être en masquant les sites d'épissage ou en empêchant l'assemblage des complexes d'épissage. Par exemple, une étude a révélé que SNORD27 peut à la fois diriger la méthylation de l'ARNr 18S et réguler l'épissage alternatif du pré-ARNm E2F7, un répresseur transcriptionnel des gènes régulés par le cycle cellulaire, par une interaction directe ARN-ARN sans méthyler l'ARN (247). Ainsi, l'ARN du SNORD27 forme probablement un complexe protéique différent des snoARN canoniques pour effectuer sa nouvelle fonction. Or, la méthodologie employée lors de l'analyse transcriptomique ne nous a pas permis de récolter des données sur l'épissage. Il serait intéressant d'explorer un peu plus cette piste, ce qui pourrait sans doute expliquer les modifications dans l'expression de certains gènes chez le mutant.

Hormis son rôle de guide dans les modifications de pseudouridylation des ARNr, d'autres rôles potentiels du snoARN *jouvence* ont en effet été répertoriés, en particulier des effets inattendus sur l'expression de gènes qui pourraient expliquer l'impact de sa perte sur l'homéostasie proliférative et métabolique. Par conséquent, une implication de *jouvence* dans la régulation de la transcription ou même potentiellement dans la structure de la chromatine ne peut être exclue à ce stade de notre étude. Par exemple, bien que notre étude ait montré que le snoARN *jouvence* est transcrit et fonctionne dans le nucléole des cellules de drosophile, des études récentes ont montré que les snoARN peuvent également présenter des fonctions non-canoniques,

notamment en servant de substrats pour la transformation en espèces plus petites, semblables à des miARN, ou encore en ciblant les pré-ARNm de manière à influencer sur l'épissage. De ce fait, il n'en demeure pas moins que certaines espèces de snoARN présentent donc à la fois les caractéristiques et les fonctions classiques des snoARN, et peuvent être des précurseurs de miARN fonctionnels. Effectivement, une petite partie peut être transportée vers le cytoplasme, où DICER transforme immédiatement le snoARN complet en un petit ARN semblable à un miARN qui fonctionne dans l'extinction post-transcriptionnelle des gènes (227). Toutefois, dans notre cas, cette possibilité a été écartée, car l'analyse en Northern Blot n'a révélé aucune autre bande que celle du snoARN *jouvence* (148 nt).

En plus des petits ARN dérivés de snoARN (sdARN), une autre étude a rapporté la découverte d'une classe de lncARN dont les extrémités correspondent à des séquences de snoARN à boîtes C/D ou de snoARN à boîtes H/ACA, nommés des lncARN liés aux snoARN (sno-lncARN) (228). Ils sont synthétisés à partir d'introns insérés entre deux snoARN et sont composés de séquences 5' et 3' qui correspondent aux snoARN adjacents (228). Récemment, au laboratoire, un RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction) des extrémités 5' et 3' a été réalisé sur l'ADNc du locus perturbé par l'insertion d'un élément P chez le mutant *F4*, et a notamment permis de mettre en évidence deux lncARN : le LNC-2 de 568 pb contenant uniquement *jouvence* et le *sno2*, et le LNC-3 de 835 pb comprenant en revanche les trois snoARN (Fig. 59). Bien que la fonction potentielle des sno-lncARN H/ACA reste inconnue, l'analyse de sno-lncARN C/D a indiqué qu'ils se lient aux régulateurs d'épissage de la famille des Fox, modulant ainsi certains aspects de l'épissage des ARNm (228). Il reste à savoir si les sno-lncARN H/ACA fonctionnent de la même manière ou possèdent de nouvelles fonctions. De plus, certains lncARN ont montré qu'ils pouvaient modifier le contexte chromatinien près de leurs gènes cibles, en recrutant des facteurs de transcription ou des acteurs de la modification d'histones ou de la réorganisation de la chromatine, favorisant ou réprimant ainsi la transcription de gènes cibles, selon le contexte (206) (208). Au niveau transcriptionnel, la structure de la chromatine, qui dépend des modifications de ses composantes, ADN et protéines, joue un rôle de verrou pour l'activité des gènes : plus la structure est condensée et moins l'ADN est accessible aux protéines de transcription. Le degré de condensation de la chromatine est donc un élément primordial du contrôle de l'expression des gènes. Une étude a même montré que la formation d'hétérochromatine prolonge la durée de vie et contrôle la synthèse de l'ARNr chez la drosophile, tandis que les animaux dont le taux d'hétérochromatine est réduit présentent une réduction spectaculaire de la durée de vie (21). Bien que nous ayons montré par RT-PCR que les LNC2 et LNC3 sont exprimés dans l'intestin (données non présentées), il faudrait tout d'abord vérifier par Northern-Blot qu'ils sont correctement transcrits dans le type sauvage. Si tel est le cas, nous pouvons par la suite envisager d'effectuer un séquençage ChIP afin d'analyser les interactions ADN/protéines. Si l'un ou l'autre des lncARN identifiés participent au remodelage de la chromatine, ces derniers doivent former un complexe avec des protéines spécifiques. Dans notre étude, cette méthode nous permettra de déterminer la localisation des lncARN au niveau des régions intergéniques, et ainsi de savoir s'ils participent au processus de remodelage de la chromatine.



**Figure 59 – Mise à jour de la carte génomique du locus du snoARN *jouvence*.**

Plus récemment, deux lncARN ont été identifiés par RACE-PCR en isolant les extrémités 5' et 3' de l'ADNc du locus P[GAL4]4C. Le lncARN-2 de 568 pb (**bleu ciel**) comprend *jouvence* et le *sno2*, alors que le lncARN-3 de 835 pb (**vert**) contient les trois snoARN.

Notre étude a révélé qu'il existe un nombre croissant de preuves que *jouvence* peut retarder le vieillissement et augmenter la durée de vie en bonne santé des drosophiles. De plus, il semblerait que *jouvence* ait des effets multiples sur de multiples voies, mais que ces effets observés reflètent probablement les conséquences en aval d'une action primaire sur un seul mécanisme de vieillissement. D'après nos résultats de séquençage d'ARN et de qRT-PCR, nous avons montré une forte implication de la voie de signalisation de l'insuline/IGF (dont principalement le Dilp3), cette dernière ayant été maintes fois décrite comme impliquée dans la longévité, la croissance et le métabolisme des drosophiles (142). Nos résultats semblent démontrer l'existence de liens, qu'ils soient directs ou indirects, entre la voie de signalisation de l'insuline/IGF et le snoARN. Nous avons également suggéré que le snoARN *jouvence* s'associe à des partenaires protéiques non-canoniques, impliquant fortement des rôles supplémentaires pour cette classe d'ARNnc, autres que son rôle dans la biogenèse des ribosomes. Plus frappant, l'ensemble de nos données ont montré que l'expression seule du snoARN *jouvence* dans l'épithélium intestinal permet d'atténuer l'apparition de certains aspects associés au vieillissement, comme la dysplasie intestinale, la neurodégénérescence ou l'obésité, tout en garantissant une extension de la longévité des organismes modèles. Ainsi, *jouvence* se présente comme étant un outil thérapeutique prometteur dans le processus de vieillissement et dans le développement de maladies associées.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. J. Oeppen, J. W. Vaupel, Broken Limits to Life Expectancy. *Science* **296**, 1029–1031 (2002).
2. T. Niccoli, L. Partridge, Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology* **22**, R741–R752 (2012).
3. C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
4. J. H. J. Hoeijmakers, DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1475–1485 (2009).
5. C. López-Otín, L. Galluzzi, J. M. P. Freije, F. Madeo, G. Kroemer, Metabolic Control of Longevity. *Cell* **166**, 802–821 (2016).
6. D. L. Jones, T. A. Rando, Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol* **13**, 506–512 (2011).
7. D. C. Wallace, A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu Rev Genet* **39**, 359 (2005).
8. A. Ozgenc, L. A. Loeb, Werner Syndrome, Aging and Cancer. *Genome and Disease* **1**, 206–217 (2006).
9. G. Saretzki, “Telomeres, Telomerase and Ageing” in *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, Subcellular Biochemistry., J. R. Harris, V. I. Korolchuk, Eds. (Springer, 2018), pp. 221–308.
10. L. Hayflick, P. S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
11. T. de Lange, Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual Review of Genetics* (2018) <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921> (August 30, 2020).
12. B. Bernardes de Jesus, *et al.*, Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* **4**, 691–704 (2012).
13. M. Jaskelioff, *et al.*, Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice. *Nature* **469**, 102–106 (2011).
14. P. Sen, P. P. Shah, R. Nativo, S. L. Berger, Epigenetic mechanisms regulating longevity and aging. *Cell* **166**, 822–839 (2016).
15. C. Jin, *et al.*, Histone Demethylase UTX-1 Regulates *C. elegans* Life Span by Targeting the Insulin/IGF-1 Signaling Pathway. *Cell Metabolism* **14**, 161–172 (2011).
16. A. P. Siebold, *et al.*, Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 169–174 (2010).
17. P. Oberdoerffer, *et al.*, SIRT1 Redistribution on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging. *Cell* **135**, 907–918 (2008).
18. T. L. A. Kawahara, *et al.*, SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to control of NF- $\kappa$ B dependent gene expression and organismal lifespan. *Cell* **136**, 62–74 (2009).

19. L. Zhong, *et al.*, The Histone Deacetylase SIRT6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell* **140**, 280 (2010).
20. P. Oberdoerffer, D. A. Sinclair, The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 692–702 (2007).
21. K. Larson, *et al.*, Heterochromatin Formation Promotes Longevity and Represses Ribosomal RNA Synthesis. *PLoS Genetics* **8**, e1002473 (2012).
22. H. Koga, S. Kaushik, A. M. Cuervo, Protein Homeostasis and Aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev* **10**, 205–215 (2011).
23. S. Kaushik, A. M. Cuervo, Proteostasis and aging. *Nature Medicine* **21**, 1406–1415 (2015).
24. S. K. Calderwood, A. Murshid, T. Prince, The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging – A Mini-Review. *Gerontology* **55**, 550–558 (2009).
25. J.-N. Min, *et al.*, CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control. *Mol Cell Biol* **28**, 4018–4025 (2008).
26. G. A. Walker, G. J. Lithgow, Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* **2**, 131–139 (2003).
27. G. Morrow, M. Samson, S. Michaud, R. M. Tanguay, Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *The FASEB Journal* **18**, 598–599 (2004).
28. S. M. Gehrig, *et al.*, Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* **484**, 394–398 (2012).
29. D. C. Rubinsztein, G. Mariño, G. Kroemer, Autophagy and Aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
30. C. Selman, *et al.*, Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian lifespan. *Science* **326**, 140–144 (2009).
31. T. Eisenberg, *et al.*, Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* **11**, 1305–1314 (2009).
32. M. B. Jensen, H. Jasper, Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metab* **20**, 214–225 (2014).
33. V. Jovaisaite, J. Auwerx, The mitochondrial unfolded protein response - synchronizing genomes. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 74–81 (2015).
34. M. T. Ryan, N. J. Hoogenraad, Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 701–722 (2007).
35. A. Efeyan, W. C. Comb, D. M. Sabatini, Nutrient Sensing Mechanisms and Pathways. *Nature* **517**, 302–310 (2015).
36. L. Fontana, L. Partridge, V. D. Longo, Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science* **328**, 321–326 (2010).
37. D. B. Friedman, T. E. Johnson, A Mutation in the Age-1 Gene in *Caenorhabditis Elegans* Lengthens Life and Reduces Hermaphrodite Fertility. *Genetics* **118**, 75–86 (1988).



38. C. Kenyon, J. Chang, E. Gensch, A. Rudner, R. Tabtiang, A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–464 (1993).
39. B. Schumacher, *et al.*, Delayed and Accelerated Aging Share Common Longevity Assurance Mechanisms. *PLoS Genet* **4** (2008).
40. G. A. Garinis, G. T. J. van der Horst, J. Vijg, J. H. J. Hoeijmakers, DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* **10**, 1241–1247 (2008).
41. O. Renner, A. Carnero, Mouse models to decipher the PI3K signaling network in human cancer. *Curr. Mol. Med.* **9**, 612–625 (2009).
42. G. Mariño, *et al.*, Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16268–16273 (2010).
43. S. C. Johnson, P. S. Rabinovitch, M. Kaeberlein, mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**, 338–345 (2013).
44. D. E. Harrison, *et al.*, Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**, 392–395 (2009).
45. S. Alers, A. S. Löffler, S. Wesselborg, B. Stork, Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol* **32**, 2–11 (2012).
46. V. N. Anisimov, *et al.*, If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany NY)* **3**, 148–157 (2011).
47. J. T. Rodgers, *et al.*, Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature* **434**, 113–118 (2005).
48. D. Harman, Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* **11**, 298–300 (1956).
49. L. A. Sena, N. S. Chandel, Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* **48**, 158–167 (2012).
50. S. Hekimi, J. Lapointe, Y. Wen, Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* **21**, 569–576 (2011).
51. R. Doonan, *et al.*, Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **22**, 3236–3241 (2008).
52. Y. Zhang, *et al.*, Mice Deficient in Both Mn Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase-1 Have Increased Oxidative Damage and a Greater Incidence of Pathology but No Reduction in Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64A**, 1212–1220 (2009).
53. V. I. Pérez, *et al.*, The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* **8**, 73–75 (2009).
54. A. Hiona, *et al.*, Mitochondrial DNA Mutations Induce Mitochondrial Dysfunction, Apoptosis and Sarcopenia in Skeletal Muscle of Mitochondrial DNA Mutator Mice. *PLoS One* **5** (2010).
55. A. P. Gomes, *et al.*, Declining NAD<sup>+</sup> Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial

Communication during Aging. *Cell* **155**, 1624–1638 (2013).

56. I. H. Lee, *et al.*, A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3374–3379 (2008).
57. A. Giralt, F. Villarroya, SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J* **444**, 1–10 (2012).
58. X. Qiu, K. Brown, M. D. Hirschey, E. Verdin, D. Chen, Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metabolism* **12**, 662–667 (2010).
59. D. R. Green, L. Galluzzi, G. Kroemer, Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109–1112 (2011).
60. J. Campisi, Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685–705 (2013).
61. N. Herranz, J. Gil, Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* **128**, 1238–1246.
62. D. J. Baker, *et al.*, Clearance of p16 Ink4a -positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
63. D. J. Baker, *et al.*, Naturally occurring p16 Ink4a -positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
64. A. Matheu, *et al.*, Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* **8**, 152–161 (2009).
65. J. M. van Deursen, The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
66. M. Wang, *et al.*, Rejuvenating Strategies of Tissue-specific Stem Cells for Healthy Aging. *Aging Dis* **10**, 871–882 (2019).
67. M. Rera, *et al.*, Modulation of longevity and tissue homeostasis by the Drosophila PGC-1 homolog. *Cell Metab* **14**, 623–634 (2011).
68. N. Shyh-Chang, G. Q. Daley, L. C. Cantley, Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* **140**, 2535–2547 (2013).
69. M. Lavasani, *et al.*, Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun* **3**, 608 (2012).
70. A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen, Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* **4**, 166–175 (2012).
71. H. E. Lynch, *et al.*, Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* **30**, 366–373 (2009).
72. J. S. Tilstra, *et al.*, NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest* **122**, 2601–2612 (2012).
73. A. S. Adler, *et al.*, Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- $\kappa$ B activity. *Genes Dev* **21**, 3244–3257 (2007).
74. J. Xie, X. Zhang, L. Zhang, Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacological Research* **67**, 60–67 (2013).
75. K. M. Rothgiesser, S. Erener, S. Waibel, B. Lüscher, M. O. Hottiger, SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B-dependent

- gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci* **123**, 4251–4258 (2010).
76. A. R. Pont, N. Sadri, S. J. Hsiao, S. Smith, R. J. Schneider, mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance and suppression of senescence by activation of telomerase transcription. *Mol Cell* **47**, 5–15 (2012).
  77. G. Zhang, *et al.*, Hypothalamic Programming of Systemic Aging Involving IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and GnRH. *Nature* **497**, 211–216 (2013).
  78. A. Satoh, *et al.*, Sirt1 Extends Life Span and Delays Aging in Mice through the Regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metabolism* **18**, 416–430 (2013).
  79. M. Jura, Leslie. P. Kozak, Obesity and related consequences to ageing. *Age (Dordr)* **38** (2016).
  80. W. Cai, *et al.*, Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 4940–4945 (2014).
  81. W. Cai, *et al.*, Oral Glycotoxins Determine the Effects of Calorie Restriction on Oxidant Stress, Age-Related Diseases, and Lifespan. *Am J Pathol* **173**, 327–336 (2008).
  82. B. Chassaing, *et al.*, Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **519**, 92–96 (2015).
  83. L. Partridge, Intervening in ageing to prevent the diseases of ageing. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **25**, 555–557 (2014).
  84. D. Omodei, L. Fontana, Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett* **585**, 1537–1542 (2011).
  85. M. Tatar, *et al.*, A Mutant Drosophila Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science* **292**, 107–110 (2001).
  86. D. J. Clancy, *et al.*, Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein. *Science* **292**, 104–106 (2001).
  87. M. Holzenberger, *et al.*, IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**, 182–187 (2003).
  88. M. Blüher, B. B. Kahn, C. R. Kahn, Extended Longevity in Mice Lacking the Insulin Receptor in Adipose Tissue. *Science* **299**, 572–574 (2003).
  89. Y. Suh, *et al.*, Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *PNAS* **105**, 3438–3442 (2008).
  90. J. Guevara-Aguirre, *et al.*, Growth Hormone Receptor Deficiency is Associated With a Major Reduction in Pro-aging Signaling, Cancer and Diabetes in Humans. *Sci Transl Med* **3**, 70ra13 (2011).
  91. C. M. McCay, M. F. Crowell, L. A. Maynard, The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* **5**, 155–171; discussion 172 (1989).
  92. J. C. Jiang, E. Jaruga, M. V. Repnevskaya, S. M. Jazwinski, An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *The FASEB Journal* **14**, 2135–2137 (2000).
  93. M. D. W. Piper, L. Partridge, D. Raubenheimer, S. J. Simpson, Dietary restriction and ageing: a unifying perspective. *Cell Metab* **14**, 154–160 (2011).

94. R. J. Colman, *et al.*, Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 201 (2009).
95. R. Weindruch, R. L. Walford, S. Fligiel, D. Guthrie, The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake. *J Nutr* **116**, 641–654 (1986).
96. W. P. Vermeij, *et al.*, Diet restriction delays accelerated aging and genomic stress in DNA repair deficient mice. *Nature* **537**, 427 (2016).
97. R. J. Colman, M. T. Beasley, D. B. Allison, R. Weindruch, Attenuation of Sarcopenia by Dietary Restriction in Rhesus Monkeys. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **63**, 556 (2008).
98. J. F. Trepanowski, R. E. Canale, K. E. Marshall, M. M. Kabir, R. J. Bloomer, Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutrition Journal* **10**, 107 (2011).
99. A. E. Civitarese, *et al.*, Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans. *PLoS Medicine* **4** (2007).
100. C. Cantó, J. Auwerx, Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 325–331 (2009).
101. S.-H. Lee, J.-H. Lee, H.-Y. L. & K.-J. Min, Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Reports* **52**, 24–34 (2019).
102. L. Fontana, S. Klein, Aging, Adiposity, and Calorie Restriction. *JAMA* **297**, 986–994 (2007).
103. F. Picard, *et al.*, Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature* **429**, 771 (2004).
104. B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
105. L. Galluzzi, F. Pietrocola, B. Levine, G. Kroemer, Metabolic Control of Autophagy. *Cell* **159**, 1263–1276 (2014).
106. B. D. Sitzmann, *et al.*, Impact of Moderate Calorie Restriction on the Reproductive Neuroendocrine Axis of Male Rhesus Macaques. *Open Longevity Science* **3**, 38 (2010).
107. A. P. B. Gollücke, D. A. Ribeiro, Use of grape polyphenols for promoting human health: a review of patents. *Recent Pat Food Nutr Agric* **4**, 26–30 (2012).
108. H. R. Vasanthi, R. P. Parameswari, J. DeLeiris, D. K. Das, Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 1505–1512 (2012).
109. K. T. Howitz, *et al.*, Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191–196 (2003).
110. J. A. Baur, *et al.*, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337–342 (2006).
111. M. Lagouge, *et al.*, Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* **127**, 1109–1122 (2006).
112. D. Porquet, *et al.*, Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8.

*Age (Dordr)* **35**, 1851–1865 (2013).

113. R. S. Hundal, *et al.*, Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **49**, 2063–2069 (2000).
114. R. J. Dowling, P. J. Goodwin, V. Stambolic, Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med* **9**, 33 (2011).
115. J. H. B. Scarpello, Improving survival with metformin: the evidence base today. *Diabetes & Metabolism* **29**, 6S36–6S43 (2003).
116. V. N. Anisimov, *et al.*, Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Experimental Gerontology* **40**, 685–693 (2005).
117. A. Martin-Montalvo, *et al.*, Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* **4**, 2192 (2013).
118. G. Zhou, *et al.*, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167–1174 (2001).
119. R. A. Miller, *et al.*, Rapamycin, But Not Resveratrol or Simvastatin, Extends Life Span of Genetically Heterogeneous Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66A**, 191–201 (2011).
120. D. W. Lamming, *et al.*, Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* **335**, 1638–1643 (2012).
121. V. D. Longo, L. Fontana, Intermittent supplementation with rapamycin as a dietary restriction mimetic. *Aging (Albany NY)* **3**, 1039–1040 (2011).
122. A. Sanz, J. Gómez, P. Caro, G. Barja, Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr* **38**, 327–333 (2006).
123. A. Sanz, P. Caro, J. G. Sanchez, G. Barja, Effect of Lipid Restriction on Mitochondrial Free Radical Production and Oxidative DNA Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1067**, 200–209 (2006).
124. R. Pamplona, G. Barja, Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**, 496–508 (2006).
125. H. Ooka, P. E. Segall, P. S. Timiras, Histology and survival in age-delayed low-tryptophan-fed rats. *Mech. Ageing Dev.* **43**, 79–98 (1988).
126. R. Sinha, *et al.*, Dietary methionine restriction inhibits prostatic intraepithelial neoplasia in TRAMP mice. *The Prostate* **74**, 1663–1673 (2014).
127. V. L. Malloy, *et al.*, Methionine restriction prevents the progression of hepatic steatosis in leptin-deficient obese mice. *Metabolism - Clinical and Experimental* **62**, 1651–1661 (2013).
128. P. Caro, *et al.*, Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* **10**, 579–592 (2009).
129. B. C. Lee, A. Kaya, V. N. Gladyshev, Methionine restriction and lifespan control. *Ann N Y Acad Sci* **1363**, 116–124 (2016).
130. B. P. Braeckman, J. R. Vanfleteren, Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*

- 42**, 90–98 (2007).
131. M. Barbieri, M. Bonafè, C. Franceschi, G. Paolisso, Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **285**, E1064–E1071 (2003).
  132. Y. Takahashi, *et al.*, A homozygous kinase-defective mutation in the insulin receptor gene in a patient with leprechaunism. *Diabetologia* **40**, 412–420 (1997).
  133. H. M. Brown-Borg, K. E. Borg, C. J. Meliska, A. Bartke, Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **384**, 33–33 (1996).
  134. O. Puig, M. T. Marr, M. L. Ruhf, R. Tjian, Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev.* **17**, 2006–2020 (2003).
  135. H. Tran, *et al.*, DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Science* **296**, 530–534 (2002).
  136. G. J. P. L. Kops, *et al.*, Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**, 316–321 (2002).
  137. S. Broughton, L. Partridge, Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem J* **418**, 1–12 (2009).
  138. J. B. Dorman, B. Albiner, T. Shroyer, C. Kenyon, The Age-1 and Daf-2 Genes Function in a Common Pathway to Control the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* **141**, 1399–1406 (1995).
  139. Y. Honda, S. Honda, Oxidative Stress and Life Span Determination in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **959**, 466–474 (2002).
  140. K. D. Kimura, H. A. Tissenbaum, Y. Liu, G. Ruvkun, *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277**, 942–946 (1997).
  141. A. Dillin, D. K. Crawford, C. Kenyon, Timing Requirements for Insulin/IGF-1 Signaling in *C. elegans*. *Science* **298**, 830–834 (2002).
  142. S. J. Broughton, *et al.*, Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3105–3110 (2005).
  143. H. Bai, P. Kang, M. Tatar, *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* **11**, 978–985 (2012).
  144. W. Brogiolo, *et al.*, An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology* **11**, 213–221 (2001).
  145. M. E. Giannakou, *et al.*, Long-Lived *Drosophila* with Overexpressed *dFOXO* in Adult Fat Body. *Science* **305**, 361–361 (2004).
  146. E. Bolukbasi, *et al.*, Intestinal Fork Head Regulates Nutrient Absorption and Promotes Longevity. *Cell Reports* **21**, 641–653 (2017).
  147. M. Rera, R. I. Clark, D. W. Walker, Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *PNAS* **109**, 21528–21533 (2012).

148. S. Wullschlegel, R. Loewith, M. N. Hall, TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
149. R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
150. T. Vellai, *et al.*, Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620–620 (2003).
151. P. Kapahi, *et al.*, Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology* **14**, 885–890 (2004).
152. W. R. Swindell, Meta-Analysis of 29 Experiments Evaluating the Effects of Rapamycin on Life Span in the Laboratory Mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **72**, 1024–1032 (2017).
153. M. D. W. Piper, L. Partridge, *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1864**, 2707–2717 (2018).
154. J. Apfeld, G. O'Connor, T. McDonagh, P. S. DiStefano, R. Curtis, The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* **18**, 3004–3009 (2004).
155. D. Stenesen, *et al.*, Dietary adenine controls adult lifespan via adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK, and regulates the longevity benefit of caloric restriction. *Cell Metab* **17**, 101–112 (2013).
156. M. Ulgherait, A. Rana, M. Rera, J. Graniel, D. W. Walker, AMPK modulates tissue and organismal aging in a cell-non-autonomous manner. *Cell Rep* **8**, 1767–1780 (2014).
157. B. Onken, M. Driscoll, Metformin Induces a Dietary Restriction–Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* **5** (2010).
158. C. Slack, A. Foley, L. Partridge, Activation of AMPK by the Putative Dietary Restriction Mimetic Metformin Is Insufficient to Extend Lifespan in *Drosophila*. *PLoS One* **7** (2012).
159. T. Aigaki, K. Seong, T. Matsuo, Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* **123**, 1531–1541 (2002).
160. Y.-J. Lin, L. Seroude, S. Benzer, Extended Life-Span and Stress Resistance in the *Drosophila* Mutant methuselah. *Science* **282**, 943–946 (1998).
161. M. R. Wallenfang, R. Nayak, S. DiNardo, Dynamics of the male germline stem cell population during aging of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **5**, 297–304 (2006).
162. S. Cvejic, Z. Zhu, S. J. Felice, Y. Berman, X.-Y. Huang, The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* **6**, 540–546 (2004).
163. L. E. D. Gimenez, *et al.*, Modulation of Methuselah Expression Targeted to *Drosophila* Insulin-producing Cells Extends Life and Enhances Oxidative Stress Resistance. *Aging Cell* **12**, 121–129 (2013).
164. R. Delanoue, *et al.*, *Drosophila* insulin release is triggered by adipose Stunted ligand to brain Methuselah receptor. *Science* **353**, 1553–1556 (2016).
165. B. Rogina, R. A. Reenan, S. P. Nilsen, S. L. Helfand, Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science* **290**, 2137–2140 (2000).
166. P.-Y. Wang, *et al.*, Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span. *PNAS* **106**, 9262–9267 (2009).

167. B. Rogina, S. L. Helfand, Indy Mutations and Drosophila Longevity. *Front. Genet.* **4** (2013).
168. L. Fontana, L. Partridge, V. D. Longo, Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. *Science* **328**, 321–326 (2010).
169. M. Kaeberlein, M. McVey, L. Guarente, The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).
170. H. A. Tissenbaum, L. Guarente, Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227–230 (2001).
171. R. Whitaker, *et al.*, Increased expression of Drosophila Sir 2 extends life span in a dose-dependent manner. *Aging (Albany NY)* **5**, 682–691 (2013).
172. L. Bordone, *et al.*, SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* **6**, 759–767 (2007).
173. Y. Kanfi, *et al.*, The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **483**, 218–221 (2012).
174. J. G. Wood, *et al.*, Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **115**, 1564–1569 (2018).
175. A. B. Hwang, D.-E. Jeong, S.-J. Lee, Mitochondria and Organismal Longevity. *Curr Genomics* **13**, 519–532 (2012).
176. J. Feng, F. Bussi ere, S. Hekimi, Mitochondrial Electron Transport Is a Key Determinant of Life Span in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* **1**, 633–644 (2001).
177. J. M. Copeland, *et al.*, Extension of Drosophila Life Span by RNAi of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Current Biology* **19**, 1591–1598 (2009).
178. J. Lapointe, S. Hekimi, Early Mitochondrial Dysfunction in Long-lived Mcl1+/- Mice. *J Biol Chem* **283**, 26217–26227 (2008).
179. S.-J. Lee, A. B. Hwang, C. Kenyon, Inhibition of Respiration Extends C. elegans Life Span via Reactive Oxygen Species that Increase HIF-1 Activity. *Current Biology* **20**, 2131–2136 (2010).
180. B. Biteau, *et al.*, Lifespan Extension by Preserving Proliferative Homeostasis in Drosophila. *PLoS Genet* **6** (2010).
181. M. G. Dozmorov, C. B. Giles, K. A. Koelsch, J. D. Wren, Systematic classification of non-coding RNAs by epigenomic similarity. *BMC Bioinformatics* **14**, S2 (2013).
182. C. N. Watson, A. Belli, V. Di Pietro, Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease. *Front. Genet.* **10** (2019).
183. M. Kato, X. Chen, S. Inukai, H. Zhao, F. J. Slack, Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in C. elegans. *RNA* **17**, 1804–1820 (2011).
184. M. Kato, F. J. Slack, Ageing and the Small, Non-Coding RNA World. *Ageing Res Rev* **12**, 429–435 (2013).
185. S. S. K. and S.-J. V. Lee, Non-Coding RNAs in *Caenorhabditis elegans* Aging. *Molecules and Cells* **42**, 379–385 (2019).
186. C. Ib a nez-Ventoso, *et al.*, Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis*



- elegans*. *Aging Cell* **5**, 235–246 (2006).
187. A. de Lencastre, *et al.*, MicroRNAs Both Promote and Antagonize Longevity in *C. elegans*. *Current Biology* **20**, 2159–2168 (2010).
  188. M. Boehm, F. Slack, A Developmental Timing MicroRNA and Its Target Regulate Life Span in *C. elegans*. *Science* **310**, 1954–1957 (2005).
  189. D. P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
  190. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
  191. L. P. Lim, *et al.*, The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **17**, 991–1008 (2003).
  192. L. He, G. J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* **5**, 522–531 (2004).
  193. J. Wang, J. Chen, S. Sen, MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology* **231**, 25–30 (2016).
  194. T. Smith-Vikos, F. J. Slack, MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci* **125**, 7–17 (2012).
  195. X. M. Caravia, C. López-Otín, “Regulatory Roles of miRNAs in Aging” in *MicroRNA: Basic Science: From Molecular Biology to Clinical Practice*, Advances in Experimental Medicine and Biology., G. Santulli, Ed. (Springer International Publishing, 2015), pp. 213–230.
  196. X. Liu, K. Fortin, Z. Mourelatos, MicroRNAs: Biogenesis and Molecular Functions. *Brain Pathology* **18**, 113–121 (2008).
  197. Y. Lee, K. Jeon, J.-T. Lee, S. Kim, V. N. Kim, MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* **21**, 4663–4670 (2002).
  198. M. Vora, *et al.*, Deletion of microRNA-80 Activates Dietary Restriction to Extend *C. elegans* Healthspan and Lifespan. *PLOS Genetics* **9**, e1003737 (2013).
  199. E. E. Dzakah, *et al.*, Loss of miR-83 extends lifespan and affects target gene expression in an age-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Genetics and Genomics* **45**, 651–662 (2018).
  200. N. Liu, *et al.*, The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **482**, 519–523 (2012).
  201. J. Yang, *et al.*, MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene *atg9*. *Age (Dordr)* **35**, 11–22 (2013).
  202. S. M. Esslinger, *et al.*, *Drosophila* miR-277 controls branched-chain amino acid catabolism and affects lifespan. *RNA Biology* **10**, 1042–1056 (2013).
  203. E.-M. Weick, E. A. Miska, piRNAs: from biogenesis to function. *Development* **141**, 3458–3471 (2014).
  204. D. M. Ozata, I. Gainetdinov, A. Zoch, D. O’Carroll, P. D. Zamore, PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics* **20**, 89–108 (2019).
  205. F. Zhong, *et al.*, A SnoARN-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes. *Nucleic Acids Res* **43**, 10474–10491 (2015).

206. J. J. Quinn, H. Y. Chang, Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics* **17**, 47–62 (2016).
207. I. Grammatikakis, A. C. Panda, K. Abdelmohsen, M. Gorospe, Long noncoding RNAs (lncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. *Ageing (Albany NY)* **6**, 992–1009 (2014).
208. A. C. Mallory, A. Shkumatava, LncRNAs in vertebrates: Advances and challenges. *Biochimie* **117**, 3–14 (2015).
209. S. Kour, P. C. Rath, Long noncoding RNAs in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* **26**, 1–21 (2016).
210. R. A. Gupta, *et al.*, Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071–1076 (2010).
211. V. Tripathi, *et al.*, Long Noncoding RNA MALAT1 Controls Cell Cycle Progression by Regulating the Expression of Oncogenic Transcription Factor B-MYB. *PLOS Genetics* **9**, e1003368 (2013).
212. P. B. Essers, *et al.*, A Long Noncoding RNA on the Ribosome Is Required for Lifespan Extension. *Cell Reports* **10**, 339–345 (2015).
213. G. A. Stepanov, *et al.*, Regulatory Role of Small Nucleolar RNAs in Human Diseases. *BioMed Research International* **2015**, e206849 (2015).
214. K. Mannoor, J. Liao, F. Jiang, Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1826**, 121–128 (2012).
215. Y.-P. Mei, *et al.*, Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* **31**, 2794–2804 (2012).
216. R. Gstir, *et al.*, Generation of a neuro-specific microarray reveals novel differentially expressed noncoding RNAs in mouse models for neurodegenerative diseases. *RNA* **20**, 1929–1943 (2014).
217. E. Maxwell, M. Fournier, THE SMALL NUCLEOLAR RNAs. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 897–934 (1995).
218. T. Kiss, Small Nucleolar RNAs: An Abundant Group of Noncoding RNAs with Diverse Cellular Functions. *Cell* **109**, 145–148 (2002).
219. N. J. Watkins, M. T. Bohnsack, The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *WIREs RNA* **3**, 397–414 (2012).
220. L. B. Weinstein, J. A. Steitz, Guided tours: from precursor snoARN to functional snoRNP. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 378–384 (1999).
221. A. K. Henras, C. Dez, Y. Henry, RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current Opinion in Structural Biology* **14**, 335–343 (2004).
222. X. Darzacq, *et al.*, Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *The EMBO Journal* **21**, 2746–2756 (2002).
223. B. E. Jady, T. Kiss, A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO Journal* **20**, 541–551 (2001).
224. A. Marnef, P. Richard, N. Pinzon, T. Kiss, Targeting vertebrate intron-encoded box C/D 2'-O-methylation

- guide RNAs into the Cajal body. *Nucleic Acids Res* **42**, 6616–6629 (2014).
225. T. Bratkovič, J. Božič, B. Rogelj, Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic Acids Res* **48**, 1627–1651 (2020).
226. M. Falaleeva, S. Stamm, Processing of snoARNs as a new source of regulatory non-coding RNAs snoARN fragments form a new class of functional RNAs. *Bioessays* **35**, 46–54 (2013).
227. C. Ender, *et al.*, A Human snoARN with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell* **32**, 519–528 (2008).
228. Q.-F. Yin, *et al.*, Long Noncoding RNAs with snoARN Ends. *Molecular Cell* **48**, 219–230 (2012).
229. K. Tyc, J. A. Steitz, U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J* **8**, 3113–3119 (1989).
230. D. A. Samarsky, M. J. Fournier, Functional Mapping of the U3 Small Nucleolar RNA from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3431–3444 (1998).
231. Y.-T. Yu, U. T. Meier, RNA-guided isomerization of uridine to pseudouridine—pseudouridylation. *RNA Biology* **11**, 1483–1494 (2014).
232. B. E. Jády, E. Bertrand, T. Kiss, Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* **164**, 647–652 (2004).
233. G. Dieci, M. Preti, B. Montanini, Eukaryotic snoARNs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics* **94**, 83–88 (2009).
234. E. Petfalski, T. Dandekar, Y. Henry, D. Tollervey, Processing of the Precursors to Small Nucleolar RNAs and rRNAs Requires Common Components. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 1181–1189 (1998).
235. T. Kiss, E. Fayet, B. E. Jády, P. Richard, M. Weber, Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 407–417 (2006).
236. J. W. S. Brown, D. F. Marshall, M. Echeverria, Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in Plant Science* **13**, 335–342 (2008).
237. S. Massenet, E. Bertrand, C. Verheggen, Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA Biology* **14**, 680–692 (2017).
238. J. Kufel, P. Grzechnik, Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. *Trends in Genetics* **35**, 104–117 (2019).
239. T. Bratkovič, J. Božič, B. Rogelj, Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic Acids Res* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1140> (February 19, 2020).
240. S. Kishore, S. Stamm, The snoARN HBII-52 Regulates Alternative Splicing of the Serotonin Receptor 2C. *Science* **311**, 230–232 (2006).
241. K. A. Brandis, *et al.*, Box C/D Small Nucleolar RNA (snoARN) U60 Regulates Intracellular Cholesterol Trafficking. *J. Biol. Chem.* **288**, 35703–35713 (2013).
242. J. R. Mitchell, E. Wood, K. Collins, A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**, 551–555 (1999).
243. T. Vulliamy, *et al.*, The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**, 432–435 (2001).

244. J.-P. Bachellerie, J. Cavallé, A. Hüttenhofer, The expanding snoARN world. *Biochimie* **84**, 775–790 (2002).
245. A. Baudin-Baillieu, *et al.*, Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Res* **37**, 7665–7677 (2009).
246. M. McMahon, A. Contreras, D. Ruggero, Small RNAs with big implications: New insights into H/ACA snoARN function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**, 173–189 (2015).
247. M. Falaleeva, *et al.*, Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *PNAS* **113**, E1625–E1634 (2016).
248. T. Schubert, *et al.*, Df31 Protein and snoARNs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin. *Molecular Cell* **48**, 434–444 (2012).
249. T. Schubert, G. Längst, Changes in higher order structures of chromatin by RNP complexes. *RNA Biology* **10**, 175–179 (2013).
250. C. Huang, *et al.*, A snoARN modulates mRNA 3' end processing and regulates the expression of a subset of mRNAs. *Nucleic Acids Res* **45**, 8647–8660 (2017).
251. S. Kishore, *et al.*, The snoARN MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum Mol Genet* **19**, 1153–1164 (2010).
252. Y. Soeno, *et al.*, Identification of novel ribonucleo-protein complexes from the brain-specific snoARN MBII-52. *RNA* **16**, 1293–1300 (2010).
253. M. S. Scott, *et al.*, Human box C/D snoARN processing conservation across multiple cell types. *Nucleic Acids Res* **40**, 3676–3688 (2012).
254. B. Lemaitre, I. Miguel-Aliaga, The Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics* **47**, 377–404 (2013).
255. H. Jiang, B. A. Edgar, Intestinal stem cell function in *Drosophila* and Mice. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 354–360 (2012).
256. I. Miguel-Aliaga, H. Jasper, B. Lemaitre, Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **210**, 357–396 (2018).
257. J. G. Stoffolano, A. T. Haselton, The adult Dipteran crop: a unique and overlooked organ. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 205–225 (2013).
258. R. Klapper, The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mechanisms of Development* **95**, 47–54 (2000).
259. P. Cognigni, A. P. Bailey, I. Miguel-Aliaga, Enteric Neurons and Systemic Signals Couple Nutritional and Reproductive Status with Intestinal Homeostasis. *Cell Metabolism* **13**, 92–104 (2011).
260. N. Buchon, *et al.*, Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* **3**, 1725–1738 (2013).
261. A. Marianes, A. C. Spradling, Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *eLife* **2**, e00886 (2013).
262. R. R. Dubreuil, Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *The International*

263. C. A. Micchelli, N. Perrimon, Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* **439**, 475–479 (2006).
264. B. Ohlstein, A. Spradling, The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439**, 470–474 (2006).
265. Z. Guo, E. Lucchetta, N. Rafel, B. Ohlstein, Maintenance of the Adult *Drosophila* Intestine: All Roads Lead to Homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **40**, 81–86 (2016).
266. B. Ohlstein, A. Spradling, Multipotent *Drosophila* Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling. *Science* **315**, 988–992 (2007).
267. H. Jiang, B. A. Edgar, Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp Cell Res* **317**, 2780–2788 (2011).
268. A. Casali, E. Batlle, Intestinal Stem Cells in Mammals and *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **4**, 124–127 (2009).
269. R. Beehler-Evans, C. A. Micchelli, Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* **142**, 654–664 (2015).
270. J. A. Veenstra, H.-J. Agricola, A. Sellami, Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res* **334**, 499–516 (2008).
271. X. Zeng, S. X. Hou, Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut. *Development* **142**, 644–653 (2015).
272. B. Biteau, H. Jasper, EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* **138**, 1045–1055 (2011).
273. N. H. Choi, E. Lucchetta, B. Ohlstein, Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *PNAS* **108**, 18702–18707 (2011).
274. L. E. O'Brien, S. S. Soliman, X. Li, D. Bilder, Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* **147**, 603–614 (2011).
275. B. Biteau, C. E. Hochmuth, H. Jasper, JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell* **3**, 442–455 (2008).
276. G. Lin, N. Xu, R. Xi, Paracrine Wingless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature* **455**, 1119–1123 (2008).
277. A. Amcheslavsky, N. Ito, J. Jiang, Y. T. Ip, Tuberous sclerosis complex and Myc coordinate the growth and division of *Drosophila* intestinal stem cells. *J Cell Biol* **193**, 695–710 (2011).
278. F. Ren, *et al.*, Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21064–21069 (2010).
279. M. M. Rahman, X. Franch-Marro, J. L. Maestro, D. Martin, A. Casali, Local Juvenile Hormone activity regulates gut homeostasis and tumor growth in adult *Drosophila*. *Sci Rep* **7** (2017).
280. J. Korzelius, *et al.*, Escargot maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells. *The EMBO Journal* **33**, 2967–2982 (2014).

281. N. Buchon, D. Osman, All for one and one for all: Regionalization of the *Drosophila* intestine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **67**, 2–8 (2015).
282. D. Dutta, *et al.*, Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Reports* **12**, 346–358 (2015).
283. I. Driver, B. Ohlstein, Specification of regional intestinal stem cell identity during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **141**, 1848–1856 (2014).
284. S. R. Singh, X. Zeng, Z. Zheng, S. X. Hou, The adult *Drosophila* gastric and stomach organs are maintained by a multipotent stem cell pool at the foregut/midgut junction in the cardia (proventriculus). *Cell Cycle* **10**, 1109–1120 (2011).
285. M. Strand, C. A. Micchelli, Quiescent gastric stem cells maintain the adult *Drosophila* stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17696–17701 (2011).
286. S. Takashima, M. Mkrtychyan, A. Younossi-Hartenstein, J. R. Merriam, V. Hartenstein, The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. *Nature* **454**, 651–655 (2008).
287. F. D.T., A. C. Spradling, The *Drosophila* hindgut lacks constitutively active adult stem cells but proliferates in response to tissue damage. *Cell Stem Cell* **5**, 290–297 (2009).
288. R. I. Clark, *et al.*, Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. *Cell Rep* **12**, 1656–1667 (2015).
289. L. Guo, J. Karpac, S. L. Tran, H. Jasper, PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell* **156**, 109–122 (2014).
290. J. C. Regan, *et al.*, Sex difference in pathology of the ageing gut mediates the greater response of female lifespan to dietary restriction. *eLife* **5**.
291. B. Hudry, S. Khadayate, I. Miguel-Aliaga, The sexual identity of adult intestinal stem cells controls organ size and plasticity. *Nature* **530**, 344–348 (2016).
292. H. Li, Y. Qi, H. Jasper, Preventing age-related decline of gut compartmentalization limits microbiota dysbiosis and extends lifespan. *Cell Host Microbe* **19**, 240–253 (2016).
293. N. Buchon, N. A. Broderick, S. Chakrabarti, B. Lemaitre, Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev* **23**, 2333–2344 (2009).
294. N.-H. Choi, J.-G. Kim, D.-J. Yang, Y.-S. Kim, M.-A. Yoo, Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* **7**, 318–334 (2008).
295. K. Siudeja, *et al.*, Frequent Somatic Mutation in Adult Intestinal Stem Cells Drives Neoplasia and Genetic Mosaicism during Aging. *Cell Stem Cell* **17**, 663–674 (2015).
296. P. H. Patel, D. Dutta, B. A. Edgar, Niche Appropriation by *Drosophila* Intestinal Stem Cell Tumors. *Nat Cell Biol* **17**, 1182–1192 (2015).
297. K. Ito, *et al.*, The Organization of Extrinsic Neurons and Their Implications in the Functional Roles of the Mushroom Bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* **5**, 52–77 (1998).
298. R. Strauss, M. Heisenberg, A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **13**, 1852–1861 (1993).

299. J. R. Martin, T. Raabe, M. Heisenberg, Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **185**, 277–288 (1999).
300. J. Martin, P. Faure, R. Ernst, The power law distribution for walking-time intervals correlates with the ellipsoid-body in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **15**, 205–219 (2001).
301. T. Sakai, T. Kitamoto, Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. *J. Neurobiol.* **66**, 821–834 (2006).
302. J.-R. Martin, R. Ernst, M. Heisenberg, Mushroom Bodies Suppress Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* **5**, 179–191 (1998).
303. M. Heisenberg, Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 266–275 (2003).
304. E. L. Arrese, J. L. Soulages, INSECT FAT BODY: ENERGY, METABOLISM, AND REGULATION. *Annu Rev Entomol* **55**, 207–225 (2010).
305. H. Zheng, X. Yang, Y. Xi, Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sciences* **167**, 22–31 (2016).
306. L. P. Musselman, R. P. Kühnlein, *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology* **221** (2018).
307. S. Grönke, *et al.*, Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism* **1**, 323–330 (2005).
308. P. E. Bickel, J. T. Tansey, M. A. Welte, PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 419–440 (2009).
309. S. Grönke, *et al.*, Control of Fat Storage by a *Drosophila* PAT Domain Protein. *Current Biology* **13**, 603–606 (2003).
310. D. S. Hwangbo, B. Gershman, M.-P. Tu, M. Palmer, M. Tatar, *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429**, 562–566 (2004).
311. K. K. Banerjee, *et al.*, dSir2 in the Adult Fat Body, but Not in Muscles, Regulates Life Span in a Diet-Dependent Manner. *Cell Reports* **2**, 1485–1491 (2012).
312. L. Liu, *et al.*, Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell* **160**, 177–190 (2015).
313. S. Soulé, L. Mellottée, A. Arab, C. Chen, J.-R. Martin, Jouvence a small nucleolar RNA required in the gut extends lifespan in *Drosophila*. *Nature Communications* **11**, 1–21 (2020).
314. J.-S. Yang, *et al.*, OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research. *PLoS One* **6** (2011).
315. D. Ling, P. M. Salvaterra, Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLOS ONE* **6**, e17762 (2011).
316. W. Song, J. A. Veenstra, N. Perrimon, Control of Lipid Metabolism by Tachykinin in *Drosophila*. *Cell Reports* **9**, 40–47 (2014).
317. L. E. O'Brien, Regional Specificity in the *Drosophila* Midgut: Setting Boundaries with Stem Cells. *Cell*

*Stem Cell* **13**, 375–376 (2013).

318. A. Weiss, A. Herzig, H. Jacobs, C. F. Lehner, Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Current Biology* **8**, S1 (1998).
319. H. Li, J. M. Tennessen, Methods for studying the metabolic basis of *Drosophila* development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **6** (2017).
320. T. Wang, Y. Jiao, C. Montell, Dissection of the pathway required for generation of vitamin A and for *Drosophila* phototransduction. *J Cell Biol* **177**, 305–316 (2007).
321. C. Gomez-Diaz, *et al.*, A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nature Communications* **7**, 1–17 (2016).
322. Y. H. Belgacem, J.-R. Martin, Disruption of insulin pathways alters trehalose level and abolishes sexual dimorphism in locomotor activity in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* **66**, 19–32 (2006).
323. Z.-P. HUANG, *et al.*, Genome-wide analyses of two families of snoARN genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoARNs. *RNA* **11**, 1303–1316 (2005).
324. H. Jiang, *et al.*, Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* **137**, 1343–1355 (2009).
325. H. Jiang, B. A. Edgar, EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development* **136**, 483–493 (2009).
326. F. Radtke, H. Clevers, O. Riccio, From gut homeostasis to cancer. *Curr. Mol. Med.* **6**, 275–289 (2006).
327. A. C. N. Wong, A. S. Vanhove, P. I. Watnick, The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech* **9**, 271–281 (2016).
328. M. H. Sieber, C. S. Thummel, The DHR96 Nuclear Receptor Controls Triacylglycerol Homeostasis in *Drosophila*. *Cell Metab* **10**, 481–490 (2009).
329. M. Buszczak, X. Lu, W. A. Segraves, T. Y. Chang, L. Cooley, Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase. *Genetics* **160**, 1511–1518 (2002).
330. J. Karpac, B. Biteau, H. Jasper, Misregulation of an Adaptive Metabolic Response Contributes to the Age-Related Disruption of Lipid Homeostasis in *Drosophila*. *Cell Reports* **4**, 1250–1261 (2013).
331. K. kannan, Y.-W. Fridell, Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Drosophila* **4**, 288 (2013).
332. G. Solinas, J. Borén, A. G. Dulloo, De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab* **4**, 367–377 (2015).
333. S. Jinn, *et al.*, snoARN U17 Regulates Cellular Cholesterol Trafficking. *Cell Metabolism* **21**, 855–867 (2015).
334. C. W. Joyce, *et al.*, ACAT1 and ACAT2 Membrane Topology Segregates a Serine Residue Essential for Activity to Opposite Sides of the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Mol Biol Cell* **11**, 3675–3687 (2000).



335. S. Acton, *et al.*, Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518–520 (1996).
336. H. Hauser, *et al.*, Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* **37**, 17843–17850 (1998).
337. E. Levy, *et al.*, Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *Journal of Cell Science* **117**, 327–337 (2004).
338. M. Werder, *et al.*, Role of Scavenger Receptors SR-BI and CD36 in Selective Sterol Uptake in the Small Intestine. *Biochemistry* **40**, 11643–11650 (2001).
339. M. F. Linton, H. Tao, E. F. Linton, P. G. Yancey, SR-BI, a Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 461–472 (2017).
340. E. C. Johnson, W. L. Pak, Electrophysiological study of *Drosophila* rhodopsin mutants. *J Gen Physiol* **88**, 651–673 (1986).
341. D. R. Giovannucci, R. S. Stephenson, Identification and distribution of dietary precursors of the *Drosophila* visual pigment chromophore: analysis of carotenoids in wild type and *ninaD* mutants by HPLC. *Vision Research* **39**, 219–229 (1999).
342. C. Kiefer, E. Sumser, M. F. Wernet, J. von Lintig, A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *PNAS* **99**, 10581–10586 (2002).
343. J. Yang, J. E. O'Tousa, Cellular sites of *Drosophila* NinaB and NinaD activity in vitamin A metabolism. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 49–56 (2007).
344. L. Herboso, A. Talamillo, C. Pérez, R. Barrio, Expression of the Scavenger Receptor Class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 603–611 (2011).
345. O. Voolstra, *et al.*, The *Drosophila* Class B Scavenger Receptor NinaD-I Is a Cell Surface Receptor Mediating Carotenoid Transport for Visual Chromophore Synthesis. *Biochemistry* **45**, 13429–13437 (2006).
346. J. M. Dietschy, S. D. Turley, Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **45**, 1375–1397 (2004).
347. Soccio Raymond E., Breslow Jan L., Intracellular Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1150–1160 (2004).
348. M. Carvalho, *et al.*, Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development* **137**, 3675–3685 (2010).
349. D. Stern, Body-size evolution: How to evolve a mammoth moth. *Current Biology* **11**, R917–R919 (2001).
350. S. Oldham, R. Böhni, H. Stocker, W. Brogiolo, E. Hafen, Genetic control of size in *Drosophila*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 945–952 (2000).
351. I. Conlon, M. Raff, Size Control in Animal Development. *Cell* **96**, 235–244 (1999).
352. A. R. Saltiel, C. R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).
353. J. Baker, J. P. Liu, E. J. Robertson, A. Efstratiadis, Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**, 73–82 (1993).

354. H. Tamemoto, *et al.*, Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182–186 (1994).
355. D. J. Withers, *et al.*, Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900–904 (1998).
356. M. Barbieri, M. Bonafè, C. Franceschi, G. Paolisso, Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **285**, E1064–E1071 (2003).
357. J. Colombani, D. S. Andersen, P. Léopold, Secreted Peptide Dilp8 Coordinates Drosophila Tissue Growth with Developmental Timing. *Science* **336**, 582–585 (2012).
358. R. Böhni, *et al.*, Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a Drosophila Homolog of Vertebrate IRS1–4. *Cell* **97**, 865–875 (1999).
359. J. Montagne, *et al.*, Drosophila S6 Kinase: A Regulator of Cell Size. *Science* **285**, 2126–2129 (1999).
360. S. J. Leever, D. Weinkove, L. K. MacDougall, E. Hafen, M. D. Waterfield, The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *The EMBO Journal* **15**, 6584–6594 (1996).
361. J. Verdu, M. A. Buratovich, E. L. Wilder, M. J. Birnbaum, Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB. *Nat. Cell Biol.* **1**, 500–506 (1999).
362. H. Zhang, *et al.*, Deletion of Drosophila insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. *PNAS* **106**, 19617–19622 (2009).
363. R. S. Garofalo, Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **13**, 156–162 (2002).
364. C. Yang, P. Belawat, E. Hafen, L. Y. Jan, Y.-N. Jan, Drosophila Egg-Laying Site Selection as a System to Study Simple Decision-Making Processes. *Science* **319**, 1679–1683 (2008).
365. T. Ikeya, M. Galic, P. Belawat, K. Nairz, E. Hafen, Nutrient-Dependent Expression of Insulin-like Peptides from Neuroendocrine Cells in the CNS Contributes to Growth Regulation in Drosophila. *Current Biology* **12**, 1293–1300 (2002).
366. E. J. Rulifson, S. K. Kim, R. Nusse, Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science* **296**, 1118–1120 (2002).
367. J. A. Veenstra, Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res* **336**, 309–323 (2009).
368. M. Tatar, *et al.*, A Mutant Drosophila Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science* **292**, 107–110 (2001).
369. T. Kiss, E. Fayet-Lebaron, B. E. Jádý, Box H/ACA Small Ribonucleoproteins. *Molecular Cell* **37**, 597–606 (2010).
370. C. Cadwell, H. J. Yoon, Y. Zebajadian, J. Carbon, The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6175–6183 (1997).
371. E. Giordano, I. Peluso, S. Senger, M. Furia, minify, A Drosophila Gene Required for Ribosome Biogenesis. *J Cell Biol* **144**, 1123–1133 (1999).

372. C. Dez, *et al.*, Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res* **29**, 598–603 (2001).
373. J. p. Girard, *et al.*, GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *The EMBO Journal* **11**, 673–682 (1992).
374. C. Isaac, Y. Yang, U. Thomas Meier, Nopp140 Functions as a Molecular Link Between the Nucleolus and the Coiled Bodies. *J Cell Biol* **142**, 319–329 (1998).
375. H.-K. Chen, C.-Y. Pai, J.-Y. Huang, N.-H. Yeh, Human Nopp140, Which Interacts with RNA Polymerase I: Implications for rRNA Gene Transcription and Nucleolar Structural Organization. *Mol Cell Biol* **19**, 8536–8546 (1999).
376. U. T. Meier, G. Blobel, A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus. *J Cell Biol* **111**, 2235–2245 (1990).
377. A. Henras, *et al.*, Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *The EMBO Journal* **17**, 7078–7090 (1998).
378. V. Tikou, *et al.*, Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat Commun* **8** (2017).
379. N. T. Ingolia, Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Reviews Genetics* **15**, 205–213 (2014).
380. J. He, *et al.*, Targeted disruption of Dkc1, the gene mutated in X-linked dyskeratosis congenita, causes embryonic lethality in mice. *Oncogene* **21**, 7740–7744 (2002).
381. J. Karijolic, Y.-T. Yu, Modifying the genetic code: Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature* **474**, 395 (2011).

# ANNEXES

## Figure 40A

Génotype	Nombre de mouches	Moyenne (jours)	Médiane (jours)	90% de mortalité (jours)	P-value
<i>F4, MYO1A-GAL4 &gt; F4</i> <sup>(1)</sup>	312	28,43	28	36	
<i>UAS-RNAi-GstE5 &gt; F4</i> <sup>(2)</sup>	256	22,34	23	27	
<i>F4, MYO1A-GAL4 &gt; UAS-RNAi-GstE5</i>	213	32,15	34	42	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>

## Figure 40B

<i>F4, MYO1A-GAL4 &gt; F4</i> <sup>(1)</sup>	312	28,43	28	36	
<i>UAS-RNAi-LysB &gt; F4</i> <sup>(1)</sup>	223	28,96	30	34	
<i>F4, MYO1A-GAL4 &gt; UAS-RNAi-LysB</i>	240	40,68	39	55	0 <sup>(1)</sup> 0 <sup>(2)</sup>

## Figure 40C

<i>F4, Mex-GS &gt; UAS-cDNA-Cyp4p2 (sans RU486)</i>	198	36,11	38	48	
<i>F4, Mex-GS &gt; UAS-cDNA-Cyp4p2 (avec RU486)</i>	238	34,24	36	44	0,0049

## Figure 56

<i>Dilp39-GAL4 &gt; CS</i> <sup>(1)</sup>	252	36,63	37	43	
<i>F4 ; Dilp39-GAL4 &gt; F4</i> <sup>(2)</sup>	193	18,78	18	24	0 <sup>(1)</sup>
<i>F4 ; Dilp39-GAL4 &gt; UAS-jou</i>	112	21,18	22	26	4,7.10 <sup>-9</sup> (2)
<i>F4 ; Dilp39-GAL4 &gt; UAS-sno2</i>	213	26,07	27	33	0 <sup>(2)</sup>
<i>F4 ; Dilp39-GAL4 &gt; UAS-sno3</i>	229	41,54	45	53	0 <sup>(2)</sup>
<i>F4 ; Dilp39-GAL4 &gt; UAS-sno2&amp;3</i>	237	40,92	43	51	0 <sup>(2)</sup>

## Figure 58A

<i>CG8997-GS &gt; UAS-RNAi-minifly (sans RU486)</i>	230	46,79	49	67	
<i>CG8997-GS &gt; UAS-RNAi-minifly (avec RU486)</i>	206	46,72	51	67	0,823

### Figure 58B

<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Gar1</i></b> (sans RU486)	232	42,37	46	54	4,1.10 <sup>-7</sup>
<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Gar1</i></b> (avec RU486)	229	44,68	50	58	

### Figure 58C

<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Nhp2</i></b> (sans RU486)	212	36,5	43	53	0
<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Nhp2</i></b> (avec RU486)	234	45,94	53	69	

### Figure 58D

<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Nopp140</i></b> (sans RU486)	186	35,1	39	53	0,0014
<b><i>CG8997-GS&gt;UAS-RNAi-Nopp140</i></b> (avec RU486)	240	40,54	43	59	

#### Tableau SI – Résumé statistique des tests de longévité.

Les longévités ont été réalisées sur des mouches femelles non vierges. L'accouplement avec les mâles a duré trois jours. Tous les croisements ont été faits dans le même sens : femelles vierges \* mâles. Les différentes lignées *GAL4-GS* utilisées durant cette étude ont été induites par l'ajout de RU486 dans le milieu nutritif standard à une concentration finale fixée à 25 µg.mL<sup>-1</sup>, sauf indication contraire. Les différences significatives entre les lignées et leurs contrôles respectifs ont été déterminées en utilisant le test du Log-rank déterminé par le logiciel d'analyse OASIS v.2.