

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'EFFET DE LA RESTRICTION CALORIQUE SUR LA
NEURODÉGÉNÉRESCENCE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SAMAR NAILI-DOUAOUDA

JANVIER 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude éternelle envers ma directrice de recherche, la professeure Claire Bénard, dont le soutien inestimable et les conseils éclairés ont été essentiels tout au long de cette recherche. Ton expertise, ta patience et ton dévouement ont grandement contribué à la réussite de ce mémoire. Au-delà de tes compétences en tant que chercheuse, je tiens à saluer ta disponibilité constante et ton ouverture d'esprit. Tu as créé un environnement de travail collaboratif où l'apprentissage et la créativité ont pu s'épanouir. Ton mentorat va bien au-delà de ce mémoire ; Il a eu un impact durable sur ma formation académique et mon développement personnel. Je suis honorée d'avoir eu l'opportunité de travailler sous ta direction, et je suis reconnaissante de la confiance que tu as placée en moi tout au long de ce voyage académique. Merci du fond du cœur.

Je tiens également à remercier la Pre Diana Alison Averill et le Pr Alex Parker d'avoir accepté de participer à ce jury et de me faire l'honneur de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse.

Je remercie également tous les enseignants qui ont joué un rôle fondamental dans mon parcours académique au cours de cette maîtrise. Je leur suis profondément reconnaissante pour l'impact qu'ils ont eu sur mon développement académique et professionnel. J'exprime aussi ma profonde reconnaissance à la fondation UQAM et au CERMO-FC pour l'octroi de deux bourses qui m'ont grandement encouragé à continuer et à améliorer ma formation.

Et comment ne pas remercier très sincèrement notre incroyable responsable de recherche, Lise Rivollet ! Merci pour tout, pour tes conseils, pour ta patience inépuisable à toutes mes questions posées, mais aussi ta sympathie, ton humour, ton écoute et ton soutien pendant ces deux dernières années. Je te remercie sincèrement et te souhaite le meilleure dans tous tes projets.

Je tiens également à remercier sincèrement les membres exceptionnels de notre laboratoire. Votre collaboration, votre expertise et votre soutien ont joué un rôle essentiel dans le développement et la réalisation de ce mémoire. J'ai eu la chance de travailler avec des collègues dévoués, passionnés, ouverts et accueillants et votre présence a su embellir ces deux dernières années. Chacun de vous

a apporté une touche unique et a favorisé une atmosphère de travail stimulante et agréable. Je tiens à remercier particulièrement Marin Pascal et Ivan Valette pour leurs précieux conseils et nos (un peu trop) longues discussions jusqu'à très tard au laboratoire mais surtout, pour tous les fous rires partagés. Sans vous, ça n'aurait pas été pareil. Vous avez grandement contribué à égayer ma maîtrise. Merci pour votre amitié.

Mes remerciements vont ensuite à mes amis, qui m'ont fait rire lorsque j'en avais besoin et qui m'ont soutenue tout au long de ma vie, plus particulièrement à mon frère, Nazim, ma belle sœur Sara et ma plus chère amie Yasmine. Merci de faire partie de ma vie.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, notamment mon père Abderrazak, ma mère Houria et ma tante Mila. Je vous suis très reconnaissante pour le soutien que vous m'avez apporté. Merci d'être toujours présents, dans les bons moments mais surtout les plus difficiles. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis et qui me permet d'avancer dans la vie. Je remercie également ma belle-famille pour leurs encouragements, et plus largement tous ceux qui m'ont soutenu et été là pour moi.

Et bien évidemment, le meilleur pour la fin... Comment ne pas te remercier, Hani, mon mari mais surtout mon meilleur ami. Tous les mots du monde ne suffiraient pas pour exprimer pleinement ma gratitude pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. Sans toi, ce travail n'aurait *littéralement* jamais eu lieu. Merci mille fois pour ton soutien et ton amour inconditionnels. L'avenir nous appartient !

À tous, merci.

DÉDICACE

À Hani, un partenaire de vie inégalable.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xv
RÉSUMÉ	1
ABSTRACT	2
CHAPITRE 1 Introduction	3
1.1 Mise en contexte.....	3
1.2 La restriction calorique.....	5
1.2.1 Historique et évolution de la recherche sur la restriction calorique et le vieillissement.....	5
1.2.2 Introduction à la notion de restriction calorique	6
1.2.3 Ce que les organismes modèles nous ont appris sur les mécanismes moléculaires de la restriction calorique	7
1.2.3.1 Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	8
1.2.3.2 Les recherches sur d'autres organismes modèles (la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , la drosophile <i>Drosophila melanogaster</i> , le macaque Rhesus <i>Macaca mulatta</i>)	14
1.3 Vieillesse et neurodégénérescence	16
1.4 <i>C. elegans</i> comme modèle d'études du système nerveux.....	19
1.4.1 <i>C. elegans</i> comme modèle d'études du vieillissement neuronal	20
1.4.2 <i>C. elegans</i> comme modèle d'études des maladies neurodégénératives	23
1.4.2.1 Modèles de sclérose latérale amyotrophique	23
1.4.2.2 Modèles de la maladie de Huntington.....	24
1.6 OBJECTIFS DU PROJET : Restriction calorique et neurodégénérescence ?.....	25
CHAPITRE 2 Matériels et méthodes	26
2.1 Maintien des souches et amorces	26

2.2 Construction de souches	28
2.3 Construction d'amorces	31
2.4 ARN interférence.....	32
2.5 Tests de paraquat	35
2.6 Tests de motilité	36
2.7 Microscopie.....	36
2.8 Analyses statistiques	39
CHAPITRE 3 Résultats	41
3.1 Résultats obtenus sur le modèle de la maladie de la sclérose latérale amyotrophique	41
3.1.1 Étude de l'effet de la restriction calorique sur la sensibilité au stress oxydatif chez un modèle de sclérose latérale amyotrophique	41
3.1.2 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les défauts des neurones chez un modèle de sclérose latérale amyotrophique	42
3.1.3 Défauts du neurone ASH chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique	45
3.2 Résultats obtenus sur le modèle de la maladie de Huntington	47
3.2.1 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les défauts moteurs chez un modèle de maladie de Huntington.....	47
3.2.2 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les agrégations protéiques chez le modèle de maladie de Huntington	49
3.2.2.1 Effet de la restriction calorique médiée par la mutation <i>eat-2(ad465)</i>	49
3.2.2.2 Effet de la restriction calorique médiée par <i>drl-1</i> (ARNi).....	51
3.2.3 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les agrégations intraneuronales de la queue polyglutamique chez un modèle de maladie de Huntington	53
3.2.4 Exploration de l'autophagie dans l'effet de la restriction calorique	55
CHAPITRE 4 Discussion des résultats et perspectives.....	58
4.1 La restriction calorique exacerbe les défauts du modèle de sclérose latérale amyotrophique .	59
4.2 Le perlage dendritique pourrait représenter une étape précoce de la neurodégénérescence chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique	60
4.3 La restriction calorique atténue les défauts du modèle de la maladie de Huntington chez <i>C. elegans</i> via la diminution des agrégats de polyglutamine	62
4.4 La restriction calorique retarde l'accumulation des agrégats de polyglutamine dans les neurones de <i>C. elegans</i>	64
4.5 L'autophagie est impliquée dans la médiation de l'effet bénéfique de la restriction calorique sur le modèle de maladie de Huntington chez <i>C. elegans</i>	65
4.6 L'autophagie n'est pas le seul mécanisme responsable de la médiation de l'effet de la restriction calorique	68

4.7 L'augmentation de l'activité autophagique pourrait expliquer l'effet opposé de la restriction calorique entre les modèles de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington chez <i>C. elegans</i>	70
4.8 Vulnérabilité neuronale spécifique aux maladies neurodégénératives	71
4.8.1 Le modèle de « seuil de stress » pour expliquer la vulnérabilité neuronale sélective	72
CHAPITRE 5 Conclusion.....	77
BIBLIOGRAPHIE	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma des voies de régulation de la longévité chez divers organismes modèles.....	8
Figure 1.2 Ver adulte exprimant le rapporteur fluorescent <i>Prgef-1::gfp</i> dans la plupart des neurones	20
Figure 1.3 Changements neuroanatomiques liés à l'âge.....	22
Figure 2.1 Exemple des étapes de construction d'une souche par génétique classique chez <i>C. elegans</i>	29
Figure 2.2 Exemple des étapes de construction d'une souche chez <i>C. elegans</i> lorsque que les deux loci génétique d'intérêt se trouvent sur le même chromosome.....	30
Figure 2.3 Schémas des techniques de PCR utilisées pour le génotypage lors de la construction de souches.....	32
Figure 2.4 Illustration des neurones cholinergiques de <i>C. elegans</i>	37
Figure 2.5 Visualisation du neurone sensoriel ASH avec le rapporteur fluorescent <i>Psra-6::DsRed</i>	38
Figure 3.1 Résultats des expériences de survie suite à une exposition au stress oxydatif par paraquat chez les vers modélisant la sclérose latérale amyotrophique.....	42
Figure 3.2 Résultats de la visualisation des neurones ASH, PHA et PHB avec le colorant DiI, suite à l'exposition au paraquat chez les vers modélisant la sclérose latérale amyotrophique.....	44
Figure 3.3 Observation simultanée du neurone ASH en utilisant le marqueur fluorescent <i>Psra-6::DsRed</i> et du colorant DiO chez les vers modélisant la sclérose latérale amyotrophique.....	47
Figure 3.4 Tests de motilité (<i>thrashing assay</i>) chez les vers modélisant la maladie de Huntington.....	49
Figure 3.5 Résultats de la quantification de la taille des agrégats de la queue polyQ67 chez les vers modélisant la maladie de Huntington.....	50
Figure 3.6 Résultats des expériences de silençage du gène <i>drl-1</i> par ARNi chez les vers de type sauvage et les animaux <i>rmIs190</i> (polyQ67).....	52
Figure 3.7 Résultats de la quantification du nombre de vers qui présentent des agrégats de la queue polyQ67 à l'intérieur du neurone ASH.....	54

Figure 3.8 Résultats de la quantification du nombre de vers avec des défauts des neurones mécanosensoriels chez les vers modélisant la maladie de Huntington.....55

Figure 3.9 Résultats de la quantification de la taille de la queue polyQ67 après disruption de l'autophagie par ARNi.....57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Liste des souches étudiées.....	23
Tableau 2.2 Liste des amorces utilisées pour le génotypage.....	25
Tableau 2.3 Liste des clones bactériens utilisés pour les expériences d'ARNi.....	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

abf-2 : *AntiBacterial Factor related 2*
acs-2 : *Fatty Acid CoA Synthetase family 2*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMP : *Adenosine Monophosphate-Activated*
AMPA : *Alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid*
AMPK : *AMP-activated protein kinase*
APL-1 : *Amyloid Precursor-Like 1*
ARN : Acide RiboNucléique
ARNase : Nucléase de l'Acide Ribonucléique / Ribonucléase
ARNdb : ARN Double Brin
ARNi : ARN Interférence
ARNm : ARN Messenger
ARNpi : ARN Interagissant avec Piwi
ARNr : ARN Ribosomique
atg-1 : *AuTophagy related 1*
atg-12 : *AuTophagy related 12*
atg-13 : *AuTophagy related 13*
atg-18 : *AuTophagy related 18*
atg-6 : *AuTophagy related 6*
atg-7 : *AuTophagy related 7*
atg-8 : *AuTophagy related 8*
ATGL-1 : *Adipose TriGlyceride Lipase 1*
ATP : Adenosine TriPhosphate
ATX-3 : *Ataxin 3*
bDR : *Bacterial Dietary Restriction*
bec-1 : *BEclin homolog 1*
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
CBP : *CREB Binding Protein*
CFP : *Cyan Fluorescent Protein*
cpt-1 : *Carnitine Palmitoyl Transferase 1*
CREB : *C-AMP Response Element-Binding protein*
CUP-4 : *Coelomocyte UPtake-defective 4*

cup-5 : *Coelomocyte Uptake-defective 5*
DAF-16 : *abnormal DAuer Formation 16*
DD : *Dietary Deprivation*
dgat-2 : *Diacylglycerol O-acyltransferase 2*
DiI : *1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylIndocarbocyanine perchlorate*
DiO : *3,3'-DioctadecylOxcarbocyanine perchlorate*
dod-19 : *Downstream Of DAF-16 19*
drl-1 : *Dietary Restriction Like 1*
drr-1 : *Dietary Restriction Response 1*
drr-2 : *Dietary Restriction Response 2*
E. coli : *Escherichia coli*
EPIC : *European Prospective Investigation into Cancer and nutrition*
ETC : *Electron transport chain*
EV : *Empty vector*
F1-2-3 : *Filial 1 or 2 or 3*
fat-6 : *FATty acid desaturase 6*
fat-7 : *FATty acid desaturase 7*
FOXA : *Forkhead box A*
FOXO : *Forkhead box O*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GluN1 : *GLUtamate receptor subunit 1*
GluN2B : *GLUtamate receptor subunit 2B*
gpd-2 : *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase 2*
gst-4 : *Glutathione S-Transferase 4*
GTPase : *Guanosine TriPhosphate hydrolase enzyme*
HDL : *High Density Lipoproteins*
HIF-1 : *Hypoxia Inducible Factors 1*
HNF4 : *Hepatocyte Nuclear Factor-4*
HSF-1 : *Heat Shock Factor 1*
hsp-12.6 : *Heat Shock Protein 12.6*
hsp-16.2 : *Heat Shock Protein 16.2*
Htn-Q : *Queue polyglutamique de la huntingtine*
HTT : *Huntingtine*
IF : *Intermittent Fasting*

IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor 1*
IIS : *Insulin/IGF-1 Signaling*
IPTG : *IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside*
KLF-1 : *Krueppel-Like Factor 1*
L1-2-3-4 : *stade Larvaire 1-2-3-4*
LAC : *Lactose*
LB : *Lysogeny Broth*
LDL : *Low Density Lipoproteins*
IDR : *Liquid Dietary Restriction*
LET-363 : *lethal 363*
lgg-1 : *LC3, GABARAP and GATE-16 family 1*
lgg-2 : *LC3, GABARAP and GATE-16 family 2*
lipl-4 : *LIPase Like 5*
lys-7 : *LYSozyme 7*
MAP : *Microtubule Associated Protein*
mekk-3 : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase 3 (MAP3K3)*
mGluRs : *Metabotropic GLUtamate Receptor*
MSN : *Medium Spiny Neurons*
mtl-1 : *MeTaLlothioneine 1*
mTOR : *Mechanistic Target Of Rapamycin*
NAD : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide*
NADPH : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*
NGM : *Nematode Growth Medium*
NHR-49 : *Nuclear Hormone Receptor 49*
NHR-62 : *Nuclear Hormone Receptor 62*
NLP-7 : *Neuropeptide-Like Protein 7*
NMDA : *N-Methyl-D-Aspartate*
NRF2 : *Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*
P0 : *Parental generation*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1alpha*
pH : *Potential Hydrogen*
PHA-4 : *defective PHArynx development 4*
PINK1 : *PTEN-INDuced putative Kinase 1*

POLYQ : Queue polyglutamique
poly-Q35+ : Queue polyglutamique avec plus de 35 répétitions de polyglutamine
PQ : Paraquat
PQE-1 : *PolyQ toxicity Enhancer 1*
RAB-10 : *Ras-related protein 10*
RFP : *Red Fluorescent Protein*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RPM : *Rotation Per Minute*
SAMS-1 : *S-Adenosyl Methionine Synthetase 1*
sbp-1 : *Sterol regulatory element Binding Protein 1*
SCH9 : *Saccharomyces cerevisiae protein kinase 9*
sDR : *Solid Dietary Restriction*
SGTA : *Small Glutamine-rich, Tetratricopeptide repeat-containing protein Alpha*
SID-1 : *Systemic RNA Interference Defective 1*
SIN-3 : *yeast Switch INdependent histone deacetylase component homolog 3*
SIR2 : Sirtuine 2
SIR2.1 : Sirtuine 2.1
SIRT1 : Sirtuine 1
SKN-1 : *SKiNhead protein 1*
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
sod-1 : *Superoxide Dismutase 1*
sod-3 : *Superoxide Dismutase 3*
spp-1 : *SaPosin-like Protein family 1*
SS-PCR : *Super Selective PCR*
TFEB : *Transcription Factor EB*
UGT : *UDP-GlucuronosylTransférase*
vha-13 : *Vacuolar H ATPase 13*
vha-15 : *Vacuolar H ATPase 15*
WWP-1 : *WW domain Protein (E3 ubiquitin ligase) 1*

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C : degré Celsius

μL : microlitre

μm : micromètre

mL : millilitre

mM : millimolaire

ns : non significatif

% : pourcentage

RÉSUMÉ

Le vieillissement et les mutations génétiques sont des facteurs de risque majeurs dans le développement des maladies neurodégénératives. Parmi ces maladies, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Huntington sont toutes les deux des maladies neurodégénératives graves, à l'issue fatale. Des facteurs environnementaux divers contribuent à l'aggravation ou au contraire, à l'atténuation du développement des maladies liées au vieillissement, entre autres, la restriction calorique. En effet, la restriction calorique a montré des effets bénéfiques sur le vieillissement, y compris la réduction de l'incidence de maladies liées au vieillissement comme le diabète, les maladies cardiovasculaires et certains cancers.

Mon travail a pour but de déterminer si la restriction calorique représente une stratégie efficace pour retarder l'établissement des maladies neurodégénératives et de caractériser les effets de la restriction calorique sur la neurodégénérescence. Pour mon étude, j'utilise des modèles de *C. elegans* de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington, soumis ou non, à la restriction calorique génétique [mutants *eat-2(ad465)*] et silençage par ARN interférant du gène *drl-1* (*Dietary Restriction Like 1*). Globalement, mes résultats démontrent que l'effet de la restriction calorique dépend majoritairement du contexte de la maladie neurodégénérative dans laquelle elle intervient. Les raisons qui peuvent justifier cette variation de l'effet de la restriction calorique sont multiples. Notamment, nos résultats soutiennent l'idée que, tout comme chez d'autres organismes modèles, l'activité autophagique joue un rôle important, aussi bien dans les processus de neurodégénérescence que dans la médiation de l'effet de la restriction calorique. En somme, mon travail souligne l'importance de la restriction calorique comme approche non pharmacologique prometteuse pour la prévention de certaines maladies neurodégénératives et met en évidence le rôle de *C. elegans* comme organisme modèle précieux pour l'étude du système nerveux.

Mots clés : Restriction calorique, système nerveux, sclérose latérale amyotrophique, maladie de Huntington, *C. elegans*.

ABSTRACT

Aging and genetic mutations are major risk factors in the development of neurodegenerative diseases. Among these diseases, amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease, are severe neurodegenerative diseases with a fatal outcome. Various environmental factors contribute to the exacerbation or, conversely, the mitigation of aging-related disease development, including dietary restriction. Indeed, dietary restriction has demonstrated beneficial effects on aging, including a reduced incidence of age-related diseases such as diabetes, cardiovascular diseases, and certain cancers.

My work aims to determine whether dietary restriction represents an effective strategy to delay the onset of neurodegenerative diseases and to characterize the effects of dietary restriction on neurodegeneration. For my study, I use *Caenorhabditis elegans* models of amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease, subjected to dietary restriction via genetic means [*eat-2(ad465)* mutants and RNA interference of *drl-1* (*Dietary Restriction Like 1*)]. Overall, my results demonstrate that the effect of dietary restriction largely depends on the context of the neurodegenerative disease in which it is applied. There are multiple reasons that can justify this variation in the effect of dietary restriction. Specifically, our findings support the idea that, as seen in other model organisms, autophagic activity plays an important role in both neurodegenerative processes and in mediating the effects of dietary restriction. In summary, my work highlights the importance of dietary restriction as a promising non-pharmacological approach for the prevention of certain neurodegenerative diseases and underscores the role of *C. elegans* as a valuable model organism for the study of nervous system.

Keywords : Caloric restriction, nervous system, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, *C. elegans*.

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 Mise en contexte

Le système nerveux est le système biologique le plus élaboré de notre corps. Le cerveau, plus particulièrement, est considéré comme l'organe le plus complexe de par son aspect structurel et fonctionnel et plus particulièrement, grâce à sa capacité adaptative remarquable. En effet, tout au long de la vie et en réponse à l'expérience, l'apprentissage ou aux changements environnementaux, le cerveau peut subir une série de modifications qui influencent le développement cognitif, émotionnel et comportemental (Wyss-Coray *et al.*, 2016). Par exemple, au cours des premières années de la vie, le cerveau connaît une phase de développement rapide et intense. Les neurones se multiplient et forment de nouvelles connexions synaptiques, tandis que les voies neuronales se développent et se renforcent. Au fil du temps, des processus de maturation et de raffinement se produisent dans le cerveau ; Les connexions synaptiques qui sont fréquemment utilisées sont renforcées, tandis que celles qui sont moins sollicitées sont élaguées (Wyss-Coray *et al.*, 2016). Le cerveau atteint ainsi un niveau de maturité structurelle et fonctionnelle relativement stable. Cependant, avec l'âge, des processus de vieillissement commencent à se manifester et des modifications moléculaires, structurelles et fonctionnelles peuvent s'installer (López-Otin *et al.*, 2013).

D'abord, sur le plan moléculaire, des altérations à l'ADN, et des protéines et organites défectueux peuvent s'accumuler et induire à leur tour des changements fonctionnels ou structurels. Par exemple, l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles peut entraîner une augmentation de la production de radicaux libres nocifs, favorisant ainsi à la dégénérescence neuronale. Inévitablement, ces mécanismes interconnectés contribuent à une susceptibilité aux maladies neurodégénératives associée au vieillissement (Johri. et Beal, 2012 ; Keogh et Chinnery, 2015).

En effet, le vieillissement est un facteur de risque majeur dans l'apparition des maladies neurodégénératives et des mécanismes spécifiques qui favorisent leur progression. Par exemple, certaines maladies, comme la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington, se caractérisent par une accumulation anormale de protéines. Une des raisons qui pourrait expliquer ce phénomène

est l'altération des processus de régulation de protéines, tel que l'autophagie ou le système protéasomal, caractéristique du vieillissement (Elobeid *et al.*, 2016 ; Tanaka et Matsuda, 2014).

Bien que le vieillissement soit un facteur de risque majeur dans l'établissement des maladies neurodégénératives, il existe également d'autres éléments qui influencent leur essor. Par exemple, des mutations génétiques spécifiques peuvent prédisposer certaines personnes à développer une maladie neurodégénérative, même à un âge plus précoce (McKinnon, 2013). Ces mutations peuvent affecter la production, la structure ou la fonction des protéines impliquées dans le maintien de la santé et de la fonction neuronale. A titre d'exemple, dans le cas de la maladie de Huntington, une mutation au niveau du gène de la huntingtine induit un mauvais repliement de la protéine, causant une accumulation toxique de la huntingtine dans les neurones et subséquemment, une neurodégénérescence (McKinnon, 2013).

Outre les facteurs génétiques, plusieurs autres facteurs de risque environnementaux et liés au mode de vie, peuvent contribuer à l'apparition des maladies neurodégénératives. Parmi ces facteurs, on peut citer l'exposition aux toxines, le tabagisme ou la consommation excessive d'alcool et plus particulièrement, l'alimentation (López-Otin *et al.*, 2013).

En effet, plusieurs études sur notre alimentation et son impact sur notre santé ont suscité un intérêt croissant ces dernières années (McCay *et al.*, 1935 ; Weindruch *et al.*, 1988 ; Mattison *et al.*, 2007). Plus précisément, la restriction calorique, qui consiste à réduire l'apport calorique sans provoquer de malnutrition, a été étudiée pour ses effets potentiels sur le vieillissement. Des recherches ont montré que la restriction calorique peut prolonger la durée de vie chez de nombreux organismes, allant des levures et des vers jusqu'aux souris et même aux primates non humains (Friedman *et al.*, 1988 ; Guarente *et al.* 2005, Partridge *et al.* 2005, Tatar, 2004). De plus, l'alimentation hypocalorique a été associée à une réduction de l'incidence de plusieurs maladies liées au vieillissement, notamment le diabète, les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers (Fontana *et al.*, 2010 ; Katewa et Kapahi, 2011 ; Mair et Dillin, 2008).

Au vu des informations citées ci-dessus et en tenant compte du fait que la restriction calorique ait démontré des effets bénéfiques sur le vieillissement (considéré comme premier facteur de risque dans l'apparition des maladies neurodégénératives) et certaines maladies liées à l'âge, nous nous

sommes demandées si la restriction calorique représente une stratégie efficace pour retarder l'établissement des maladies neurodégénératives et si tel est le cas, quels seraient les mécanismes potentiels par lesquels elle pourrait influencer leur prévention ?

1.2 La restriction calorique

1.2.1 Historique et évolution de la recherche sur la restriction calorique et le vieillissement

L'idée selon laquelle la quantité de nourriture consommée peut influencer la longévité des animaux semble avoir émergé au début du XXe siècle. C'est à cette époque que Osborne *et al.* (1917) ont rapporté que parmi une cohorte de rats femelles, celles qui présentaient une croissance et une maturité sexuelle retardées vivaient plus longtemps que celles qui se développaient relativement rapidement (Osborne *et al.* 1917). Cette observation implicite a été testée ultérieurement de manière expérimentale par McCay *et al.* (1935), qui ont constaté que l'espérance de vie des rats mâles soumis à un régime alimentaire restreint était plus longue que celle des rats alimentés à volonté et que ces derniers présentaient également des dommages causés par un excès de nourriture (McCay *et al.*, 1935). Par la suite, plusieurs recherches ont été menées dans le but de comprendre comment la restriction calorique retardait les déclinés liés à l'âge. Par exemple, il a été démontré que la restriction calorique chez les rongeurs retardait le processus de vieillissement dans pratiquement tous les types de tissus biologiques évalués (Weindruch *et al.*, 1988). La restriction calorique s'est donc révélée être un outil extrêmement puissant dans l'étude du vieillissement et à la fin des années 1980, la plupart des questions méthodologiques sur l'utilisation de la restriction calorique avaient été résolues ; la réduction de l'apport énergétique était le principal facteur influençant le vieillissement. Cependant, une question demeurait : "Est-ce que la variation du niveau de restriction calorique (de modérée à sévère) a des effets différentiels sur la longévité et les maladies liées à l'âge ?". Cette question a été adressée dans des études ultérieures menées sur des primates non humains qui ont montré que des niveaux modérés de restriction calorique pouvaient considérablement réduire les troubles liés à l'âge et réduire le taux de mortalité (Mattison *et al.*, 2007).

Néanmoins, les recherches sur le vieillissement menées dans les années 1990 représentent le réel tournant concernant les études sur la restriction calorique grâce à l'utilisation d'organismes

modèles génétiquement modifiés. En effet, plusieurs chercheurs ont réussi à mettre en évidence que les gènes de longévité, nouvellement découverts à l'époque, exprimaient des protéines qui reliaient l'équilibre énergétique et la reproduction à la longévité, chez *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster* (Friedman *et al.*, 1988 ; Lakowski et Hekimi, 1998 ; Guarente *et al.* 2005, Partridge *et al.* 2005, Tatar, 2004).

L'utilisation accrue de la restriction calorique chez les invertébrés reflétait deux aspects pratiques. Tout d'abord, les économies de temps et de coûts associées à l'utilisation d'invertébrés à courte durée de vie et deuxièmement, la facilité relative d'appliquer une multitude de techniques moléculaires, permettant d'identifier les mécanismes sous-jacents des effets de la restriction calorique sur le vieillissement. Conséquemment, cela a entraîné une explosion de rapports scientifiques publiés pendant les années 2000 utilisant des espèces invertébrées dans le but de décortiquer les mécanismes de la restriction calorique.

1.2.2 Introduction à la notion de restriction calorique

La restriction calorique est une stratégie alimentaire qui repose sur le principe de réduire l'apport énergétique quotidien sans compromettre les besoins nutritionnels essentiels du corps. Il convient de souligner que la restriction calorique ne se limite pas à la simple privation de nourriture. L'objectif n'est pas de créer une malnutrition ou de priver le corps de nutriments essentiels, mais plutôt de réduire de manière contrôlée l'apport énergétique afin de favoriser des adaptations métaboliques bénéfiques pour la santé et potentiellement prolonger la durée de vie (Lee *et al.*, 2021 ; Flanagan *et al.*, 2020).

L'une des principales motivations derrière cette stratégie alimentaire est l'idée que la surconsommation alimentaire et le surpoids sont des facteurs contribuant à l'apparition de nombreuses maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'obésité et certains cancers (Jensen *et al.*, 2014). En réduisant l'apport calorique, la restriction calorique vise donc à atténuer les effets négatifs de ces maladies et à promouvoir une meilleure santé globale (Evert *et al.*, 2019).

La restriction calorique peut être mise en œuvre de différentes manières (Most *et al.*, 2017). A ce jour, les approches les plus sûres et couramment utilisées sont :

1. Limitation des macronutriments énergétiques : Cette approche consiste à limiter l'apport en certains macronutriments énergétiques, tels que les graisses ou les glucides. Par exemple, une restriction calorique basée sur les graisses peut impliquer de réduire la consommation d'aliments riches en graisses saturées, en gras trans ou en huiles ajoutées. De même, une restriction calorique basée sur les glucides peut impliquer de limiter les aliments riches en sucres ajoutés ou en glucides raffinés (Souza *et al.*, 2008).
2. Jeûne intermittent : Le jeûne intermittent est une approche de restriction calorique qui alterne des périodes de jeûne avec des périodes de consommation alimentaire normale. Il existe différentes variations de jeûne intermittent, telles que le jeûne sur une base quotidienne (par exemple, le jeûne de 16 heures par jour avec une fenêtre de consommation alimentaire de 8 heures), le jeûne en jours alternés (par exemple, une journée de jeûne, suivie d'une journée de consommation normale) ou le jeûne prolongé sur plusieurs jours (O'keefe *et al.*, 2020).
3. Approche alimentaire spécifique : Certaines approches alimentaires spécifiques, telles que le régime méditerranéen, le régime végétarien ou le régime cétogène, peuvent également inclure des éléments de restriction calorique. Par exemple, le régime méditerranéen met l'accent sur la consommation d'aliments sains tels que les fruits, les légumes, les céréales complètes, les légumineuses et les graisses saines, tout en limitant la consommation de viandes rouges et d'aliments transformés riches en calories vides (O'keefe *et al.*, 2020).

Cependant, il convient de noter que la pratique de la restriction calorique doit être abordée avec prudence et supervision, notamment chez les personnes présentant certaines conditions de santé préexistantes. Il est essentiel de veiller à maintenir un apport nutritionnel adéquat et d'adapter la pratique de la restriction calorique en fonction des besoins individuels.

1.2.3 Ce que les organismes modèles nous ont appris sur les mécanismes moléculaires de la restriction calorique

Le décryptage des mécanismes moléculaires sous-jacents par lesquels la restriction calorique prolonge la durée de vie chez les invertébrés a joué un rôle essentiel dans l'identification des voies génétiques conservées, qui médient la réponse à la restriction calorique (Fontana *et al.*, 2010 ; Katewa et Kapahi, 2011 ; Mair et Dillin, 2008). Cette section aborde les connaissances acquises à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et la

drosophile *Drosophila melanogaster*, sur les mécanismes moléculaires de la restriction calorique (Figure 1.1)

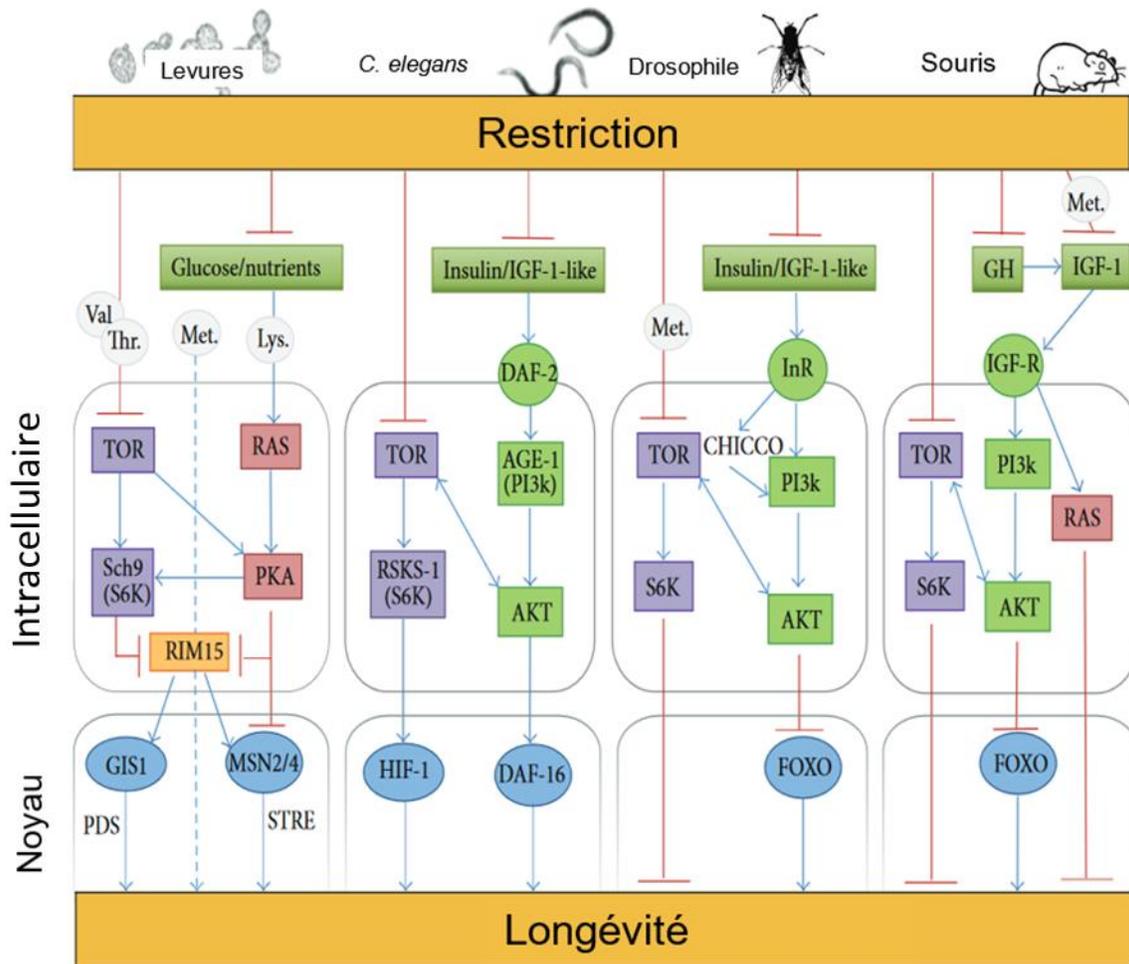


Figure 1.1 Schéma des voies de régulation de la longévité chez divers organismes modèles (levure, *C. elegans*, *D. melanogaster* et *M. musculus*). Chez le ver, les mouches et les mammifères, la restriction calorique réduit la signalisation à travers les voies IIS/TOR, désactivant la cascade de signalisation intracellulaire PI3K/Akt/TOR et activant en conséquence les facteurs de transcription de la famille FOXO, connus pour réguler la résistance au stress et le vieillissement. Chez la levure, la restriction calorique réduit l'activité des voies de signalisation des nutriments TOR/Sch9 et RAS/PKA. Lysine (Lys.), méthionine (Met.), thréonine (Thr.) et valine (Val.). Adaptée de Santos *et al.*, 2016.

1.2.3.1 Le nématode *Caenorhabditis elegans*

Le ver microscopique *C. elegans* a joué un rôle significatif dans les études sur le vieillissement en raison de ses innombrables avantages comme organisme modèle. En effet, son cycle de vie court (3 jours pour qu'un embryon devienne un adulte), sa transparence permettant d'observer son système nerveux relativement simple (302 neurones chez les hermaphrodites) tout

au long de sa vie, son génome hautement conservé (environ 80% de gènes conservés entre *C. elegans* et l'humain) et les possibilités de manipulation génétiques (interférence par ARN (ARNi) par alimentation, croisements rapides, surexpression de gènes, induction de mutations, etc) ont fait de lui un modèle de choix dans plusieurs domaines. Et pour cause, *C. elegans* s'est révélé extrêmement utile dans la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la longévité, en réponse à la restriction calorique. Plusieurs méthodes de restriction calorique ont été développées et utilisées chez *C. elegans* (révisées dans Greer et Brunet, 2009 ; Lan *et al.*, 2015), usuellement maintenu en laboratoire sur des plaques de milieu solide (milieu NGM) et sur lesquelles se développent des tapis bactériens d'*Escherichia coli* (OP50). Parmi ces méthodes de restriction calorique, le modèle génétique clé est le mutant *eat-2* (Lakowski et Hekimi, 1998). Le gène *eat-2* code pour un récepteur de l'acétylcholine nicotinique, qui fonctionne de manière post-synaptique dans le muscle pharyngé, l'appareil alimentaire de l'animal qui lui permet d'ingérer sa nourriture grâce à un pompage rapide (Avery, 1993). Cependant, chez les mutants *eat-2*, la fréquence du pompage du pharynx est fortement diminuée et par conséquent, la restriction calorique est efficacement induite (Raizen *et al.*, 1995). Suite à cette mutation, les vers présentent des phénotypes de restriction calorique observés chez d'autres espèces, notamment une durée de vie allongée d'environ 30% (Lakowski et Hekimi, 1998). Cependant, une contrainte de ce modèle est que les mutants *eat-2* sont soumis à la restriction calorique tout au long de leur développement, cas impossible à appliquer à d'autres espèces.

Afin de dépasser cette limitation, plusieurs types de restriction calorique environnementales peuvent être utilisés. Ces méthodes comprennent la dilution des bactéries dans un milieu liquide, appelée bDR (*bacterial dietary restriction* ; Panowski *et al.*, 2007) ou IDR (*liquid dietary restriction* ; Bishop et Guarente, 2007) ou à semer ces dilutions bactériennes sur des plaques de milieu solide, appelée sDR (*solid dietary restriction* ; Greer *et al.*, 2009). Des conditions plus extrêmes existent comme la privation alimentaire totale appelée DD (*dietary deprivation*) où aucune bactérie n'est semée sur les plaques (Kaeberlein *et al.*, 2006b ; Lee *et al.*, 2006), ou le jeûne intermittent IF (*intermittent fasting*) où les animaux sont déplacés entre des plaques avec et sans bactéries (Honjoh *et al.*, 2009). Contrairement aux mutants *eat-2*, la restriction calorique environnementale peut être initiée à n'importe quel moment et entraîne tout de même une prolongation significative de la durée de vie (de 30 à 50%). Ces différentes manières d'induire la

restriction calorique ont été utilisées chez *C. elegans* pour identifier plusieurs gènes et voies de signalisation qui fonctionnent de manière complexe et spécifique aux tissus.

Voie de signalisation mTOR et autophagie. La voie de signalisation conservée de mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) a été liée à la longévité par la restriction calorique chez *C. elegans*. Le capteur de nutriments mTOR (LET-363 chez *C. elegans*) est une enzyme impliquée dans la signalisation des nutriments et joue un rôle clé dans la réponse cellulaire aux conditions nutritionnelles. Des études ont montré que la restriction calorique réduit l'activité de mTOR chez *C. elegans* (Kapahi *et al.*, 2010). De plus, d'autres recherches ont été menées sur l'effet de l'inhibition de mTOR chez des vers soumis à la restriction calorique (Hansen *et al.*, 2007) et aucune prolongation supplémentaire de la durée de vie n'a été observée. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres organismes, tels que la levure (Kaeberlein *et al.*, 2005) et la drosophile (Kapahi *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que, bien que la réduction de l'activité de mTOR soit un facteur clé dans la prolongation de la durée de vie induite par la restriction calorique, il semble cependant y avoir un seuil au-delà duquel l'inhibition supplémentaire de mTOR n'entraîne pas de bénéfice supplémentaire en termes de longévité.

Plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la prolongation de la durée de vie médiée par la restriction calorique et/ou l'inhibition de mTOR ont été proposés. Un mécanisme candidat majeur est l'autophagie (Feng *et al.*, 2014). En effet, des études chez *C. elegans* utilisant des mutants *eat-2* ont montré que la modulation de l'autophagie est directement liée à la longévité induite par la restriction calorique. Par exemple, plusieurs facteurs de transcription nécessaires à la prolongation de la durée de vie induite par la restriction calorique (tels que l'orthologue de FOXA/PHA-4 et le récepteur nucléaire des hormones NHR-62 (Heestand *et al.*, 2013)), augmentent l'expression de nombreux gènes d'autophagie chez les mutants *eat-2* (Lapierre *et al.*, 2015). L'implication de l'autophagie en réponse à la restriction calorique reste donc un candidat à haut potentiel à explorer.

Voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 et DAF-16/FOXO. DAF-16/FOXO (*abnormal DAuer Formation 16/Forkhead boX O*) est un facteur de transcription, déterminé comme l'un des principaux régulateurs du processus de vieillissement chez *C. elegans* (Kenyon *et al.*, 1993 ; Lin *et al.*, 1997 ; Ogg *et al.*, 1997). L'identification de DAF-16/FOXO reposait à l'origine sur des

études concernant la formation des larves dites « dauer » (stade de diapause de *C. elegans*, crucial pour la survie dans des conditions restreintes ; Riddle *et al.*, 1981). Ces larves ont une longévité prolongée et une résistance accrue au stress. De plus, après la sortie de ce stade, la durée de vie des vers n'est pas affectée (Klass et Hirsh, 1976). Cette caractéristique des larves dauers a poussé les chercheurs à étudier les voies de signalisation impliquées dans l'initiation de ce stade et de sa longévité, afin de mieux comprendre les processus de vieillissement chez *C. elegans*. Des études ultérieures ont démontré que la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 joue un rôle bien établi dans la régulation du facteur de transcription DAF-16/FOXO, régulateur majeur dans l'initiation du stade dauer.

La voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor*) consiste en une cascade de phosphorylation conservée, qui contrôle la croissance, le métabolisme et la reproduction en réponse à la disponibilité des nutriments chez tous les eucaryotes. Chez *C. elegans*, lorsqu'un ligand analogue à l'insuline se lie au récepteur DAF-2, ce dernier s'auto-phosphoryle et entraîne une cascade de signalisation complexe qui résulte en la phosphorylation de DAF-16 et favorise sa séquestration dans le cytoplasme (Berdichevsky *et al.*, 2016). Dans des conditions de diminution de l'activité de la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1, comme dans le cas de la restriction calorique, DAF-16 se transloque dans le noyau où il module la transcription de ses gènes cibles impliqués dans l'autophagie (*lgg-1, lgg-2, bec-1, atg-7, atg-8, atg-12, atg-18*), le stockage des graisses (*sbp-1, fat-6, fat-7, nhr-49, dgat-2, acs-2, lipl-4*), le métabolisme (*sod-3, gst-4, mtl-1, gpd-2, cpt-1*), le stress cellulaire (*hsp-12.6, hsp-16.2, skn-1*) et la réponse antimicrobienne (*lys-7, abf-2, spp-1, dod-19*) (Murphy *et al.*, 2003 ; McElwee *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2007 ; Stout *et al.*, 2013).

PHA-4/FOXA. Le facteur de transcription PHA-4/FOXA (*defective PHArynx development/Forkhead boX A*) a été spécifiquement lié à la restriction calorique chez *C. elegans* (Panowski *et al.*, 2007). En effet, PHA-4/FOXA est non seulement surexprimé dans des conditions de restriction calorique mais est également nécessaire pour prolonger la durée de vie des mutants *eat-2* et des animaux soumis à la restriction calorique environnementale (Panowski *et al.*, 2007). De plus, PHA-4/FOXA n'est pas nécessaire dans la prolongation de la durée de vie des mutants *daf-2* (mutants de la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1) et *clk-1* (mutants de la respiration mitochondriale). Chez les vers adultes, PHA-4/FOXA est exprimé principalement dans l'intestin

mais aussi dans quelques neurones de la tête et de la queue, suggérant une fonction importante de ces deux tissus dans la restriction calorique (Panowski *et al.*, 2007). Comme DAF-16, PHA-4 induit également la transcription de gènes impliquées dans l'extension de la durée de vie en réponse à la restriction calorique. Il a d'ailleurs été remarqué que l'activité de DAF-16 est augmentée en présence de PHA-4, et vice versa. Cet effet synergique permet une réponse plus robuste et coordonnée à la restriction calorique. De plus, DAF-16 et PHA-4 régulent l'expression l'un de l'autre. DAF-16 peut activer directement l'expression de *pha-4*, assurant ainsi sa propre expression et maintenant une boucle de rétroaction positive. PHA-4, à son tour, peut favoriser la localisation nucléaire de DAF-16, permettant ainsi son activation et ses effets en aval (Panowski *et al.*, 2007).

Il est également important de citer l'implication de PHA-4 dans un autre modèle génétique de restriction calorique : l'inhibition de l'expression de *mekk-3* (*Mapk/Erk Kinase Kinase*), également appelé *drl-1* (*Dietary Restriction Like 1*), via ARNi (Chamoli *et al.*, 2014). MEKK3 est une kinase sérine-thréonine ayant un rôle important dans la voie de détection des nutriments et dans l'initiation de la réponse à la restriction calorique (Chamoli *et al.*, 2014). Il a été démontré que la répression de l'expression de *mekk-3* chez *C. elegans* induit à des phénotypes de restriction calorique tels que la prolongation de la durée de vie ainsi qu'une diminution du stockage de graisse et de la lipofuscine (pigment qui s'accumule progressivement dans les cellules avec l'âge, considéré chez *C. elegans* comme marqueur de vieillissement ; Chamoli *et al.*, 2014). De plus, l'inhibition de l'expression de *mekk-3* chez les mutants *eat-2* n'a pas réussi à prolonger supplémentaires leur durée de vie (Chamoli *et al.*, 2014). En outre, lorsque l'expression de *mekk-3* a été réprimée par ARNi chez des mutants *pha-4*, aucune prolongation de la durée de vie n'a été notée, similairement aux mutants *eat-2*, suggérant fortement l'implication de PHA-4 dans ces deux modèles de restriction calorique.

La diminution des niveaux de MEKK3 augmente l'expression des gènes de la bêta-oxydation par l'intermédiaire du récepteur nucléaire NHR-49/HNF4 (*Nuclear Hormone Receptor 49/Hepatocyte Nuclear Factor 4*), entraînant une diminution des réserves de graisse stockée. Ce changement métabolique vers l'oxydation des acides gras entraîne une production réduite d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sans activation des superoxyde dismutases. Conséquemment, l'augmentation de l'oxydation des acides gras conduit à la formation d'endotoxines lipophiles, ce qui active les gènes de détoxification des xénobiotiques tels que le cytochrome P450 et l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT). Tout cela est réalisé grâce aux facteurs de transcription conservés, PHA-4/FOXA, NHR-8

et le récepteur d'hydrocarbures arylés AHR-1 (Chamoli *et al.*, 2014). Ainsi, ce changement métabolique vers l'oxydation des acides gras, couplé à la détoxification des xénobiotiques, conduit à une augmentation spectaculaire de la longévité, indépendamment de la disponibilité de nourriture.

SKN-1. Le facteur de transcription Nrf2/SKN-1 (*Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2/SKINhead protein 1*) est un facteur de transcription dit « cytoprotecteur » impliqué dans plusieurs aspects de la physiologie chez plusieurs organismes (Santos *et al.*, 2016). Les premières recherches sur SKN-1 ont défini ses rôles essentiels dans le développement et les réponses au stress oxydatif, tandis que des travaux plus récents ont identifié un rôle dans les réponses à la disponibilité alimentaire chez *C. elegans* (Bishop et Guarente, 2007). Il est exprimé dans deux neurones de la tête (neurones ASI) et dans l'intestin, mais n'est cependant nécessaire que dans les neurones ASI pour médier l'extension de la durée de vie par la restriction calorique (Bishop et Guarente, 2007). Comme chez la levure, la restriction calorique augmente la respiration mitochondriale chez *C. elegans*, et ce changement de métabolisme est médié par SKN-1 spécifiquement dans les neurones ASI (Bishop et Guarente, 2007). Deux cibles potentielles de SKN-1 ont été liées à la longévité induite par la restriction calorique chez *C. elegans*, à savoir le neuropeptide NLP-7 (*Neuropeptide-Like Protein 7*), homologue de la cholécystokinine des mammifères, et le récepteur ionotrope CUP-4 (*Coelomocyte Uptake-defective 4*). NLP-7, principalement exprimé dans les neurones de la tête et est nécessaire pour la longévité des mutants *eat-2* (Park *et al.*, 2010). Quant à CUP-4 il est également nécessaire à la longue durée de vie des mutants *eat-2* ainsi que dans des conditions de restriction calorique environnementale via dilution bactérienne sur plaques (sDR ; Park *et al.*, 2010).

Autres voies moléculaires impliquées en réponse à la restriction calorique

D'autres voies moléculaires sont également impliquées en réponse à la restriction calorique mais sont encore très peu comprises. Nous retrouvons notamment le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factors 1*), qui est également une cible de la voie mTOR mais dont l'effet sur la longévité peut complètement s'inverser, dépendamment de la température (Chen *et al.*, 2009 ; Leiser *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2009). L'ubiquitine ligase WWP-1 (*WW domain Protein (E3 ubiquitin ligase) 1*) et son substrat KLF-1 (*Krueppel-Like Factor 1*), ainsi que la S-adénosylméthionine synthétase SAMS-1 (*S-Adenosyl Methionine Synthetase 1*), la GTPase RAB-10 (*Ras-related protein 10*) et les protéines DRR-1 et DRR-2 (pour *dietary restriction response*)

ont également été rapporté comme ayant un rôle dans la médiation de la longévité par la restriction calorique. En effet, la surexpression de WWP-1 et KLF-1 en réponse à la restriction calorique, est nécessaire à la longue durée de vie des mutants *eat-2* et de la restriction calorique environnementale bDR (*bacterial dietary restriction* ; Carrano *et al.*, 2009). Alors que pour SAMS-1, RAB-10, DRR-1 et DRR-2, il a été démontré que l'expression de ces gènes est réduite chez les mutants *eat-2* et que leur inhibition a réussi à prolonger la durée de vie des animaux de type sauvage, mais pas des mutants *eat-2* (Hansen *et al.*, 2005).

1.2.3.2 Les recherches sur d'autres organismes modèles (la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la drosophile *Drosophila melanogaster*, le macaque Rhesus *Macaca mulatta*)

Chez les levures, en général, les cellules sont maintenues dans un milieu standard avec 2% de glucose et utilisent un métabolisme glycolytique et fermentatif qui finissent par induire une acidification nocive du milieu de culture. Mais lorsque le glucose est limitant ou absent, une transition vers le métabolisme respiratoire mitochondrial se produit en réponse à la restriction calorique, ce qui bloque le métabolisme fermentatif dès la phase initiale de croissance et augmente la durée de vie des levures en empêchant l'acidification du milieu de culture (Burtner *et al.*, 2009). Parmi les voies de signalisation proposées responsables de la réponse à la restriction calorique chez les levures, nous pouvons citer les sirtuines SIR2 (histones désacétylases NAD-dépendantes), avec ses activités de silençage épigénétique et anti-recombinogène de l'ADN ribosomique (rDNA) ; ainsi que les kinases mTOR, AMPK et Sch9, impliquées dans les voies de signalisation des nutriments et de réponses au stress. En effet, il existe de nombreuses études étayant un rôle de ces voies de signalisation dans l'extension de la durée de vie des levures. Par exemple, il a été démontré que des mutations de perte de fonction de mTOR, AMPK et Sch9 sont suffisantes pour prolonger la durée de vie des levures (Fabrizio *et al.*, 2004; Fabrizio *et al.*, 2001; Kaerberlein *et al.*, 2005b; Lin *et al.*, 2000; Powers *et al.*, 2006) et que SIR2, même si facultative dans les cas sévères de restriction calorique, la protéine reste néanmoins indispensable dans les cas modérées de restriction calorique (Lin et Guarente, 2006).

De manière similaire aux levures et aux vers, la restriction calorique a également été étudiée chez la drosophile après que Chapman *et al.* (1995) aient remarqué que les mouches accouplées avaient une durée de vie plus courte que celle des mouches non accouplées, dû à une préférence alimentaire

accrue pour la levure, source majeure de protéines chez les mouches, afin de soutenir la production d'œufs (Ribeiro et Dickson, 2010 ; Vargas *et al.*, 2010). Il en est pareillement ressorti que les trois principales voies de signalisation des nutriments, mTOR, IIS et Sir2, ont été liées à l'extension de la durée de vie lors de la restriction calorique chez la drosophile. Depuis lors, un nombre croissant d'études ont démontré que l'inhibition de divers composants de ces voies de signalisation prolonge la durée de vie chez plusieurs espèces (Kapahi *et al.*, 2010 ; Lamming, 2016).

Concernant l'effet de la restriction calorique sur une plus longue durée de vie sur les primates, les résultats divergents entre l'étude de l'Institut national du vieillissement (Lane *et al.*, 1992) et celle de l'Université du Wisconsin (Colman *et al.*, 2014) ont suscité un débat intéressant. L'étude de l'Université du Wisconsin a démontré une prolongation de la durée de vie, avec des mâles vivant jusqu'à environ 28 ans et des femelles jusqu'à environ 30 ans, dépassant ainsi la moyenne (environ 25 ans) observée pour ces primates en captivité. En revanche, l'étude de l'Institut national du vieillissement n'a pas corroboré ces résultats, ne trouvant pas d'effet significatif de la restriction calorique sur la survie (Mattison *et al.*, 2017). Pourtant, les deux études concordent sur un point crucial : les macaques rhésus soumis à un régime restreint en calories semblaient présenter moins de conditions de santé liées à l'âge que les groupes témoins. Cela inclut des maladies comme le cancer, les affections cardiaques et le diabète, des pathologies auxquelles ces primates sont sensibles avec l'avancée en âge, tout comme les humains. Des éléments tels que la composition spécifique des régimes alimentaires, les modalités d'alimentation, l'âge initial des sujets et le contexte génétiques ont été identifiés comme des variables significatives (Mattison *et al.*, 2017). L'observation majeure est que les similitudes entre les effets bénéfiques observés chez les macaques rhésus et les humains laissent entrevoir la possibilité que la restriction calorique puisse avoir des impacts positifs sur la santé et la durée de vie humaines. Cependant, des études supplémentaires, tenant compte des particularités individuelles et des variations génétiques, restent nécessaires pour éclaircir pleinement cette relation et ses implications potentielles pour la santé humaine.

En conclusion, l'utilisation de ces organismes modèles a offert la possibilité d'approfondir la compréhension des divers processus cellulaires et voies de signalisation modifiées par la restriction calorique.

1.3 Vieillessement et neurodégénérescence

Étant donné que les maladies neurodégénératives sont courantes dans la population âgée, le vieillissement cérébral pourrait former un continuum avec la neurodégénérescence (Wyss-Coray *et al.*, 2016). En effet, des études d'autopsie réalisées sur des populations de personnes âgées relativement saines, rapportent la présence de plaques amyloïdes, de dégénérescence neurofibrillaire, de corps de Lewy, d'inclusions de protéines, de dystrophie synaptique, de perte de neurones et de perte de volume cérébral dans la plupart des cerveaux (Wyss-Coray *et al.*, 2016). Ces observations, également retrouvées chez des patients atteints de maladies neurodégénératives, varient considérablement d'un individu à l'autre. Il pourrait donc s'agir de signes précurseurs de maladies neurodégénératives ou simplement d'un processus normal de vieillissement.

López-Otin *et al.* ont identifié neuf "caractéristiques du vieillissement" appelées "*hallmarks of ageing*" qui sont devenues largement utilisées dans le domaine de la recherche sur le vieillissement. Ces caractéristiques, qui sont également identifiées dans des cas de maladies neurodégénératives, pourraient expliquer la détérioration de l'organisme et la prédisposition à la neurodégénérescence chez les sujets âgés (López-Otin *et al.*, 2013). Ci-dessous sont citées cinq caractéristiques du vieillissement les plus communes aux maladies neurodégénératives :

Augmentation des niveaux des radicaux libres. Aussi connue sous le nom de théorie du stress oxydatif, cette hypothèse est souvent utilisée pour tenter d'expliquer le processus de vieillissement et ses mécanismes. Le stress oxydatif se produit lorsque le déséquilibre se forme entre la production de radicaux libres (ou dérivés réactifs de l'oxygène ROS) et la capacité des antioxydants tels que la superoxyde dismutase SOD1, à les neutraliser (Betteridge, 2000). Ces radicaux libres peuvent être générés à la fois par des facteurs externes tels que les rayons UV et le tabagisme, ainsi que par des facteurs internes tels que l'activité de la NADPH oxydase (Stadtman, 2004). Le terme ROS englobe les molécules dont la configuration électronique est stable et qui ne sont donc pas des radicaux libres, ainsi que d'autres molécules dont la configuration électronique est instable en raison de la présence d'électrons non appariés, appelés également « radicaux libres ». Dans leur quête d'une configuration électronique stable, ces radicaux libres vont oxyder des protéines, de l'ADN ou des lipides, en leur dérobant un électron. Ce stress oxydatif peut entraîner des perturbations de l'homéostasie des protéines, l'induction de l'apoptose et la sénescence cellulaire,

qui ont été suggérées comme des causes potentielles du vieillissement (Finkel et Holbrook, 2000; Kregel et Zhang, 2006). Comprendre comment réguler ce stress oxydatif pourraient potentiellement avoir des implications thérapeutiques dans la prévention ou le ralentissement du vieillissement.

Instabilité génomique et dommages à l'ADN. Plusieurs types de dommages à l'ADN, y compris les cassures simple ou double brins, les mésappariements de bases, les insertions et les délétions, sont associés à la neurodégénérescence. Ces dommages peuvent augmenter les risques d'inflammation, accélérer le vieillissement et augmenter la susceptibilité aux cancers et aux maladies neurodégénératives (McKinnon, 2013).

Diminution de l'activité autophagique. La susceptibilité des neurones à accumuler des protéines et organites défectueux en raison de leur nature majoritairement post-mitotique, combiné au déclin (lié à l'âge) de leur activité autophagique, semblent être au cœur des processus de neurodégénérescence. En effet, des perturbations de l'autophagie ont été associées au vieillissement et à de nombreuses maladies liées à l'âge, telles que certaines maladies inflammatoires, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives (Elobeid *et al.*, 2016). De plus, des variants/polymorphismes dans les gènes d'autophagie ont été retrouvés chez de nombreux patients atteints de maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique. Cela a soulevé des questions pertinentes concernant le potentiel de l'induction de l'autophagie comme traitement contre les maladies liées à l'âge (Tanaka et Matsuda, 2014).

Dysfonctionnement mitochondrial et mitophagie. En tant que cellules métaboliquement très actives, les neurones ont des besoins énergétiques élevés et sont particulièrement sensibles aux changements de la fonction mitochondriale. Cette dernière se détériore avec l'âge et est considérée comme un contributeur majeur du processus de vieillissement. Par conséquent, dans les mitochondries endommagées, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est amplifiée, représentant ainsi un facteur additionnel dans l'établissement de maladies neurodégénératives (Johri et Beal 2012 ; Keogh et Chinnery, 2015). De plus, les mitochondries ont également des rôles clés dans plusieurs voies intracellulaires, notamment la biosynthèse des lipides, la signalisation du calcium et l'apoptose, qui sont tous des processus centraux dans le développement des maladies

neurodégénératives (Keogh et Chinnery, 2015). Dans le but d'optimiser la fonction mitochondriale, plusieurs mécanismes de contrôle de la qualité sont mis en place, notamment la mitophagie, mécanisme par lequel les mitochondries dysfonctionnelles sont sélectivement dégradées (Fivenson *et al.*, 2017 ; Koentjoro *et al.*, 2017). Une des voies importantes de mitophagie est la voie PINK1-Parkin, dans laquelle PINK1 (*PTEN-INDuced putative Kinase 1*) s'accumule sur la membrane externe dépolarisée des mitochondries et recrute l'ubiquitine ligase E3 Parkin, qui cible les protéines mitochondriales pour favoriser la dégradation des mitochondries endommagées (Koentjoro *et al.*, 2017). Il n'est donc pas étonnant que les mutations dans les gènes codant pour PINK1 ou Parkin entraînent des déficits locomoteurs chez la drosophile et le début précoce de la maladie de Parkinson récessive chez l'homme.

Sénescence cellulaire. En tant que cellules post-mitotiques, les neurones sont particulièrement vulnérables à l'accumulation de lésions à l'ADN et peuvent devenir sénescents. Dans une étude menée sur des souris âgées, Jurk *et al.* (2012) ont montré que 40 à 80 % des neurones de cellules de Purkinje et 20 à 40 % des neurones corticaux, hippocampiques et périphériques présentaient des niveaux élevés de dommages à l'ADN, de p38 MAP kinase activée, de stress oxydatif et d'activité de la β -galactosidase, associés à la sénescence (Jurk *et al.*, 2012). De plus, des études ultérieures ont mis en évidence que la précision des mécanismes de réparation de l'ADN diminue également avec l'âge (Jeppesen *et al.*, 2011). Cette combinaison entre sénescence neuronale et accumulation de dommages à l'ADN peuvent entraîner, par la suite, des maladies liées au vieillissement comme certains types de cancers ou de maladies neurodégénératives (McKinnon, 2013).

Bien que nous nous sommes principalement concentrés sur ces cinq caractéristiques du vieillissement, d'autres caractéristiques, tels que le dérèglement de la détection des nutriments et l'altération du métabolisme, l'épuisement des cellules souches, l'altération de la communication intercellulaire et de la fonction immunitaire et l'attrition des télomères, restent également importantes et jouent certainement un rôle essentiel dans les processus de neurodégénérescence car tous ces mécanismes sont étroitement liés (López-Otin *et al.*, 2013). Par exemple, la perte de cellules souches fonctionnelles est liée à presque toutes les caractéristiques du vieillissement, notamment les dommages à l'ADN, la dérégulation épigénétique, les dysfonctionnements mitochondriaux, l'inactivation de la télomérase et la sénescence cellulaire (López-Otin *et al.*, 2013).

Étant donné la nature complexe et multifactorielle des maladies neurodégénératives, les approches ciblant une seule voie pourraient être insuffisantes. Des approches plus holistiques ou des stratégies de traitement combinées pourraient être nécessaires et plus susceptibles de réussir. D'autres approches non pharmacologiques et/ou à des modifications du mode de vie pourraient également être appliquées afin de prévenir la prédominance des maladies neurodégénératives chez les personnes âgées.

1.4 *C. elegans* comme modèle d'études du système nerveux

En 1965, Sydney Brenner a choisi *Caenorhabditis elegans* comme organisme modèle afin d'étudier le développement et le comportement animal, pour des raisons maintenant bien connues. En effet, ce nématode présentait un grand potentiel pour les manipulations génétiques, en partie en raison de son cycle de vie rapide (3 jours), de sa petite taille (1 mm à l'âge adulte), de sa transparence et de sa facilité de culture en laboratoire. De plus, l'auto-fécondation des hermaphrodites combinés aux possibilités de croisements avec des mâles offrait des avantages précédemment réservés aux organismes végétaux tels que *Zea mays*. Une autre caractéristique clé était la simplicité anatomique du ver (>1000 cellules), y compris le système nerveux de l'hermaphrodite.

Le système nerveux de *C. elegans* a été entièrement décrit et cartographié en 302 neurones, soit un tiers du nombre total de cellules chez l'hermaphrodite adulte (Sulston, et Horvitz, 1977 ; White, 1986) Les corps cellulaires des neurones sont principalement regroupés dans les ganglions de la tête ou de la queue, et les synapses sont concentrées au niveau de l'anneau nerveux (« cerveau du ver ») et les cordons nerveux ventral et dorsal (Figure 1.2 ; Sulston et Horvitz, 1977). La structure des neurones de *C. elegans* est généralement simple ; chaque corps cellulaire possède une ou deux neurites, sauf exceptions (neurones FLP, PVD ; White, 1986). Les axones établissent des synapses dits « en passant » et de nombreux neurones sont interconnectés par des jonctions lacunaires avec bon nombre de neurotransmetteurs conservés des vers aux humains (acétylcholine, glutamate, dopamine, GABA). De plus, les gènes et les mécanismes sous-jacents au développement des neurones, à la formation des synapses, à la dégénérescence neuronale, à la mort cellulaire, à la régénération axonale et à la fonction gliale ont été identifiés chez le ver et présentent un haut degré d'homologie avec les vertébrés. Le système nerveux interagit également avec l'environnement

externe en réponse à différents signaux, ce qui permet d'étudier une multitude de comportements tels que la chimiotaxie, la thermotaxie, la réponse au toucher, l'accouplement, l'alimentation, etc.

Depuis les travaux pionniers de Brenner, le nématode a permis de grandes avancées scientifiques parmi lesquelles se trouvent notamment la première caractérisation complète du lignage cellulaire d'un métazoaire en développement (1983), l'identification des gènes de l'apoptose (1983, Nobel 2002), l'emploi de la protéine fluorescente verte GFP comme marqueur d'expression génique (1994, Nobel 2008), le premier séquençage complet d'un génome métazoaire (1998) et la découverte de l'ARN interférence (1998, Nobel 2006 ; Hedgecock *et al.*, 1983; Sulston *et al.*, 1983; Chalfie *et al.*, 1994 ; *C.-elegans*-Sequencing-Consortium, 1998 ; Timmons et Fire, 1998).

1.4.1 *C. elegans* comme modèle d'études du vieillissement neuronal

C. elegans a permis de mettre en évidence des changements structuraux distincts qui se produisent dans l'ensemble de son système nerveux tout au long du développement (Figure 1.2).

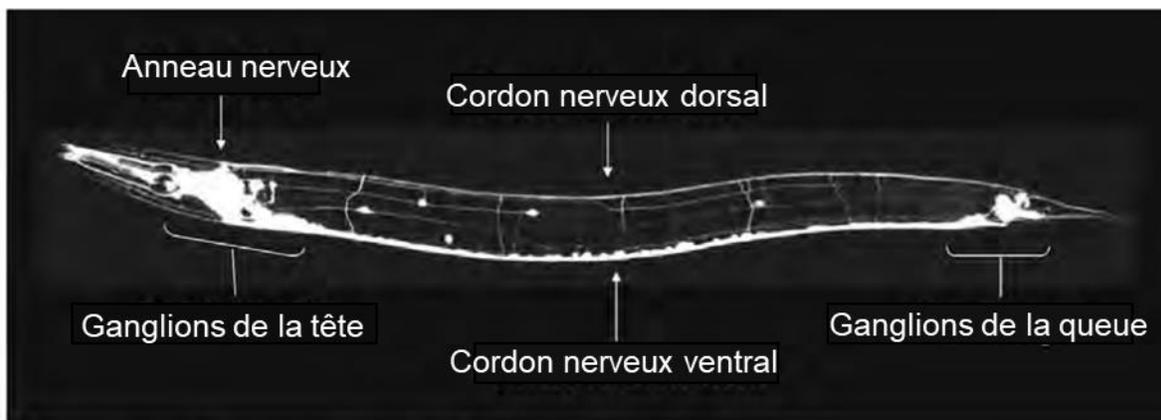


Figure 1.2 Un ver adulte exprimant le rapporteur fluorescent *Prgef-1::gfp* dans la plupart des neurones; les principaux ensembles neuronaux (ganglions de la tête et de la queue) et les neuropiles (anneau nerveux, cordon nerveux ventral et dorsal) sont visibles. Adapté de WormAtlas.

En effet, le travail de Khandekar (2015), du laboratoire Bénard, a révélé des altérations neuronales liées à l'âge chez *C. elegans*, telles que la désorganisation des ganglions, la défasciculation des faisceaux axonaux, l'altération de la morphologie des somas et la croissance et l'allongement de nouvelles neurites à partir des corps cellulaires et d'axones (Figure 1.3). L'analyse étendue de plusieurs types de neurones vieillissants, a permis de constater que des changements neuroanatomiques sélectifs et spécifiques, se produisaient au fil du temps. Fait intéressant, il a

également été montré par notre laboratoire et celui de Monica Driscoll (Herndon *et al.*, 2002) que l'intégrité des neurones reste intacte au cours du vieillissement. Cette observation a été étendue à de très vieux animaux, âgés de 20 jours (âge auquel plus de 90 % des vers de type sauvage sont décédés dans des conditions de croissance standards) et il en est ressorti que l'organisation générale de l'architecture du système nerveux et l'intégrité des neurones individuels persistaient. Ce phénomène de changements neuroanatomiques spécifiques sans mort neuronale chez *C. elegans* parallèle ce qui se produit au niveau du cerveau humain vieillissant, suggérant l'existence de mécanismes communs liés au déclin neuronal associé à l'âge. Une autre observation que Khandekar (2015) a relevé est que, bien que les changements neuronaux associés à l'âge s'accumulent progressivement et deviennent plus fréquents chez les vers âgés, ces processus commencent à s'établir dès le début de l'âge adulte. Par exemple, la corde nerveuse ventrale du vers présente une défasciculation dès les jours 1 et 2 de l'âge adulte, lorsque les vers sont à leur phase la plus vigoureuse et la plus saine et au pic de leur période reproductive.

Notre laboratoire a également établi que la durée de vie n'est pas un déterminant majeur du vieillissement neuronal, à l'aide de mutants qui vivent plus longtemps que le type sauvage (Khandekar, 2015). Il aurait été cohérent d'assumer que les changements liés à l'âge du système nerveux pourraient être retardés en cas de prolongement de la durée de vie et survenir plus tôt chez les vers à durée de vie plus courte. Néanmoins, il a été constaté que l'extension de la durée de vie chez les mutants *daf-2* et *clk-1* ne retarde pas les changements neuroanatomiques liés à l'âge, et que le raccourcissement de la durée de vie chez les mutants *daf-16* ne conduit pas à leur apparition précoce (Khandekar, 2015). Cependant, parmi ces mutants à longue durée de vie, seule la mutation *eat-2* (modèle génétique de restriction calorique) a réussi à retarder certains changements neuroanatomiques liés à l'âge tels que le positionnement postérieur de l'anneau nerveux (considéré comme « cerveau du ver ») et l'allongement des projections des neurones mécano-sensoriels de la queue PLML et PLMR (Figure 1.3) suggérant encore une fois que la restriction calorique pourrait avoir un effet bénéfique pour le système nerveux.

Comme mentionné précédemment, ces études sur le vieillissement du système nerveux chez *C. elegans* parallèlent les changements neuronaux liés à l'âge, retrouvés chez les humains. De plus, étant donné la conservation évolutive des mécanismes moléculaires qui régulent le développement et la fonction du système nerveux, entre le ver et l'humain, il est possible que l'élucidation de ces

mécanismes chez *C. elegans* puisse aider à découvrir et développer des stratégies afin d'atténuer les conséquences du vieillissement cérébral chez l'homme.

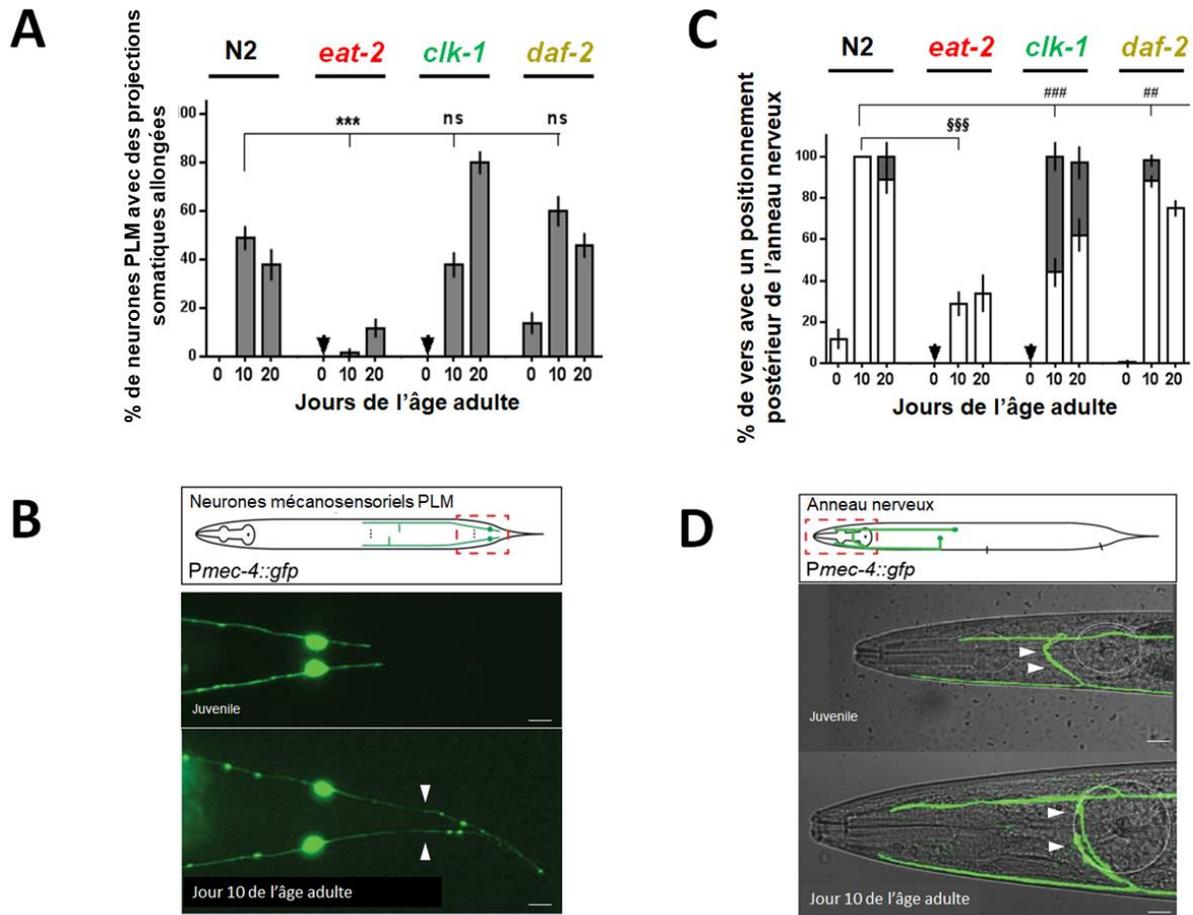


Figure 1.3 Changement neuroanatomiques liés à l'âge. **A-B.** Avec l'âge, les projections somatiques des neurones mécanosensoriels PLM (triangles blancs, neurones visualisés à l'aide du rapporteur *Pmec-4::GFP*) s'allongent. Chez le type sauvage N2 et les mutants *clk-1* et *daf-2*, les projections somatiques des neurones PLM s'allongent avec l'âge (comme illustré aux jours 10 et 20 de l'âge adulte). Par contre, chez les adultes mutants *eat-2* (jours 10 et 20 de l'âge adulte) les projections somatiques des neurones PLM ne s'allongent pas, et donc ressemblent plus à un état juvénile. **C-D.** Changement du positionnement de l'anneau nerveux (triangles blancs) avec l'âge. L'anneau nerveux a été visualisé à l'aide du rapporteur *Pmec-4::GFP*. Chez le type sauvage et les mutants *clk-1* et *daf-2*, l'anneau nerveux se déplace postérieurement avec l'âge (aux jours 10 et 20 de l'âge adulte). Le positionnement postérieur de l'anneau nerveux est moins fréquent chez les adultes mutants *eat-2* (jours 10 et 20 de l'âge adulte). Échelle, 5 μ m. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les symboles : ***, ###, §§§ représente la significativité (*p-value*). *** pour $P \leq$

0.001, ** pour $P \leq 0.01$ et * pour $P \leq 0.05$. *ns*, non significatif. Adapté de Khandekar, 2015 (résultats du laboratoire Bénard).

1.4.2 *C. elegans* comme modèle d'études des maladies neurodégénératives

Dans bon nombre de maladies neurodégénératives, la recherche sur *C. elegans* a contribué de manière significative aux connaissances actuelles sur les fonctions des gènes, l'identification des voies génétiques menant à la neurodégénérescence et à la compréhension de la dynamique des protéines pathologiques, *in vivo*. En effet, *C. elegans* représente un modèle de choix pour l'étude des maladies neurodégénératives et une multitude de souches modélisant la neurodégénérescence ont été créées à ces fins. Nous pouvons citer, par exemple, les modèles de maladie d'Alzheimer, de maladie de Parkinson, de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington. Ici, nous allons nous attarder sur les mutants *sod-1* et *htt* ou polyQ35+, modélisant respectivement la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Huntington, deux conditions neurodégénératives sur lesquelles mon projet s'est focalisé.

1.4.2.1 Modèles de sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative qui affecte environ 1 à 2 personnes sur 100 000. Les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique présentent généralement une perte progressive et sélective des neurones moteurs glutamatergiques et cholinergiques dans le cerveau et la moelle épinière (Turner *et al.*, 2013). Le gène *SOD1* (*SuperOxide Dismutase 1*) a été identifié chez l'humain comme facteur génétique causal, lié à la fois aux formes familiales et sporadiques de la sclérose latérale amyotrophique. L'homologue du gène humain *SOD1* a ensuite été identifié et étudié chez *C. elegans* : *sod-1*.

SOD1 : Les mutations dans *SOD1* contribuent à environ 20% de tous les cas de sclérose latérale amyotrophique familiale (Cudkowicz *et al.*, 1997). *SOD1* est une enzyme mitochondriale, qui catalyse la conversion des radicaux superoxydes libres, nocifs et sous-produits de la respiration mitochondriale (par exemple, $O_2^{\cdot-}$), en molécules inertes. Les mutations pathogènes dans *SOD1* peuvent altérer sa structure protéique et modifier ses interactions avec ses cofacteurs, réduisant ainsi ou hyperactivant sa fonction (Kaur, McKeown et Rashid, 2016). L'orthologue de *C. elegans*, *SOD-1*, est structurellement et fonctionnellement similaire à la *SOD1* humaine. Les mutants *sod-1* avec perte de fonction ont montré une augmentation des niveaux de radicaux superoxydes, une

durée de vie plus courte et une plus grande sensibilité aux facteurs de stress environnementaux. En revanche, la surexpression de SOD1 a augmenté les niveaux de H₂O₂, un sous-produit catalytique des réactions enzymatiques normales de la SOD1 (Yanase *et al.*, 2009). Baskoylu *et al.* (2018) ont généré des mutations associées à la maladie dans des résidus conservés de la SOD1 endogène de *C. elegans* (A4V, H71Y, L84V, G85R, G93A) grâce auxquelles ils ont pu observer une certaine neurodégénérescence spécifique aux neurones cholinergiques ou glutamatergiques, associées aux mutations de gain et perte de fonction, respectivement (Baskoylu *et al.*, 2018). Cependant, davantage de travaux concernant cette spécificité sont nécessaires, notamment car ces études ont été faites via l'utilisation de colorants qui permettent la visualisation des neurones, uniquement si ces derniers sont intacts. Des études utilisant des rapporteurs fluorescents spécifiques aux neurones sont requises afin de confirmer ces résultats.

1.4.2.2 Modèles de la maladie de Huntington

La maladie de Huntington est un trouble neurodégénératif autosomique dominant caractérisé par des dysfonctionnements cognitifs, comportementaux et moteurs, dus à une perte importante de neurones (Reiner *et al.*, 2011). Cette maladie est causée par l'expansion pathologique des répétitions du trinuécléotide CAG (qui codent pour l'acide aminé glutamine (Q)) dans l'extrémité N-terminale de la protéine huntingtine, qui joue un rôle clé dans le trafic vésiculaire et la médiation de l'endocytose (Saudou et Humbert, 2016). L'âge d'apparition et la gravité de la maladie de Huntington sont directement corrélés au nombre de répétitions de polyglutamine (polyQ) ; avoir plus de 35 répétitions glutamines entraîne inévitablement la maladie de Huntington (Bates, 2003). Cette neurodégénérescence est supposément causée par l'agrégation de fragments N-terminaux mutés de la huntingtine dans le cytoplasme (Bauer et Nukina, 2009).

Bien que *C. elegans* exprime une protéine homologue à la huntingtine qui est la protéine similaire à la huntingtine ou *Htt-like protein* (Brandi et Polticelli, 2021), l'expression de la queue polyglutamique (polyQ) de la huntingtine humaine chez *C. elegans* a largement été utilisée pour modéliser la maladie de Huntington. Faber *et al.* (2002) ont induit l'expression de différentes longueurs de la polyQ chez *C. elegans* et ont constaté que les animaux transgéniques qui exprimaient des polyQ plus longues (Htn-Q95 et Htn-Q150) présentaient certaines dysfonctions neuronales et finissaient par mourir plus tôt. Conformément aux observations cliniques, une

formation croissante d'agrégats de polyQ35+ dépendante de l'âge a été observée, présumée responsable de la perturbation de l'homéostasie des protéines (Gidalevitz *et al.*, 2006).

Actuellement, de nombreux médicaments ciblant les effets pathogènes de la huntingtine mutante ou de la poly-Q35+ sont en essais cliniques (Kumar *et al.*, 2020). L'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques et la compréhension des mécanismes d'action de la queue polyglutamique continuent d'être au cœur des recherches sur les maladies neurodégénératives.

1.6 OBJECTIFS DU PROJET : Restriction calorique et neurodégénérescence ?

Compte tenu du fait que la restriction calorique a des effets bénéfiques sur le vieillissement chez différents organismes, mon travail a pour but de : 1) Déterminer si la restriction calorique représente une stratégie efficace pour retarder l'établissement des maladies neurodégénératives et ; 2) Caractériser les effets de la restriction calorique sur la neurodégénérescence.

Pour répondre à ces questions, mon travail se focalisera sur l'utilisation de modèles de sclérose latérale amyotrophique et de la maladie de Huntington chez *C. elegans*, soumis ou non à la restriction calorique génétique (mutants *eat-2* et silençage par ARN interférant du gène *drl-1*).

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1 Maintien des souches et amorces

Les vers ont été cultivés dans un incubateur à 20 °C conformément à la procédure standard, sur des boîtes de Petri contenant 4.5 mL de *Nematode Growth Medium* (NGM ; Brenner, 1974) etensemencées avec 50 µL de la souche OP50 d'*Escherichia coli* (Hartman et Herman, 1982), sauf indication contraire. La souche N2 Bristol constitue le type sauvage de cette étude. Toutes les souches étudiées (sauvage, restriction calorique, modèles de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington et rapporteurs fluorescents) ainsi que les amorces utilisées pour la construction de ces souches sont listées, respectivement, dans les tableaux 2.1 et 2.2. Dans le but de modéliser la sclérose latérale amyotrophique chez *C. elegans*, nous avons choisi d'utiliser la souche HA3299 car celle-ci permettait un génotypage efficace et fiable.

Tableau 2.1 Liste des souches étudiées.

Souches	Génotypes	Transgènes	Références
N2			Brenner (1974)
VQ1891	<i>qvIs19 IV</i>	<i>Psra-6::DsRed2 ; cc::GFP</i>	Cette étude
VQ1445	<i>vsIs48 X</i>	<i>Punc-17::GFP</i>	Cette étude
VQ2100	<i>jsIs973 III</i>	<i>Pmec-7::mRFP</i>	Cette étude
AM49	<i>rmIs172</i>	<i>F25B3.3p::Q19::CFP</i>	Brignull <i>et al.</i> , 2006
AM44	<i>rmIS190</i>	<i>F25B3.3p::Q67::CFP</i>	Brignull <i>et al.</i> , 2006
KP1148	<i>nuls25 III</i>	<i>glr-1p::glr-1::GFP + lin-15(+)</i>	Rango <i>et al.</i> , 1998

DA465	<i>eat-2(ad465)II</i>		Lakowski et Hekimi, 1998
HA3299	<i>sod-1(rt451)II</i>		Baskoylu <i>et al.</i> 2018
VQ1989	<i>sod-1(rt451) II ; nuIs25 III</i>		Cette étude
VQ1943	<i>sod-1(rt451) eat-2(ad465) II ; nuIs25 III</i>		Cette étude
VQ2137	<i>sod-1(rt451)II ; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ2138	<i>sod-1(rt451) eat-2(ad465) II ; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ1990	<i>sod-1(rt451) II ; vsIs48 X</i>		Cette étude
VQ1981	<i>sod-1(rt451) eat-2(ad465) II ; vsIs48</i>		Cette étude
VQ1968	<i>eat-2(ad465) II ; nuIs25 III</i>		Cette étude
VQ2122	<i>eat-2(ad465) II ; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ1970	<i>eat-2(ad465) II ; vsIs48 X</i>		Cette étude
VQ2136	<i>eat-2(ad465)II ; jsIs973 III</i>		Cette étude
VQ2115	<i>rmIs172 ; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ2052	<i>rmIs172; eat-2(ad465) II</i>		Cette étude
VQ2139	<i>rmIs172; jsIs973 III</i>		Cette étude
VQ2116	<i>rmIs172; eat-2(ad465) II; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ2117	<i>rmIs190 ; qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ2054	<i>rmIs190; eat-2(ad465) II</i>		Cette étude

VQ2123	<i>rmIs190; eat-2(ad465) II;</i> <i>qvIs19 IV</i>		Cette étude
VQ2111	<i>rmIs190; jsIs973 III</i>		Cette étude
VQ2136	<i>rmIs190; eat-2(ad465)II ;</i> <i>jsIs973 III</i>		Cette étude

Tableau 2.2 Liste des amorces utilisées pour le génotypage.

Gène	Amorce	Orientation	Séquence 5' 3'	Taille du fragment (pb)
<i>eat-2(ad465)</i>	oCB2313 (mutante)	Anti-sens	TGCTCATTCGCACTGTTG GTCTTATAG GGGTTTCT	308
	oCB2379 (sauvage)	Anti-sens	ACAGAATATCGGGTTGCC	282
	oCB2276 (commune)	Sens	TGCTCATTCGCACTGTTG TTATTGTCTTATAGCCC TTTTC	
<i>sod-1(rt451)</i>	oCB2315 (mutante)	Anti-sens	TAAAGCGTGACGAGCGTGACC	398
	oCB2316 (sauvage)	Anti-sens	GTAAAGCGTGACGAGCGTGGCG	
	oCB2298 (commune)	Sens	GTGCTGTCGCTGTTCTTCG	

2.2 Construction de souches

L'une des caractéristiques les plus importantes chez *C. elegans* est la possibilité et la rapidité à générer des souches mutantes grâce aux croisements.

Afin d'expliquer comment se passe un croisement de manière simplifiée, prenons le cas le plus simple avec deux souches dont chacune porte une mutation *a* ou *b* qui sont, viables, associées à un phénotype facilement discernable sur une plaque et situées sur des chromosomes différents. Dans cette situation, il faut d'abord croiser l'une des deux souches avec des mâles N2 (souche de type

sauvage), puis croiser les mâles hétérozygotes résultants avec la seconde souche pour générer des hétérozygotes $a/+$; $b/+$. Étant donné que dans ce cas, les mutations présentent des phénotypes facilement identifiables, il sera relativement simple d'isoler les vers issus de la progéniture grâce à leur phénotype puis identifier, par la suite, les plaques homozygotes pour ces mutations en confirmant que tous les vers issus de l'auto-fécondation sur la plaque présentent les phénotypes des mutations a et b (Figure 2.1).

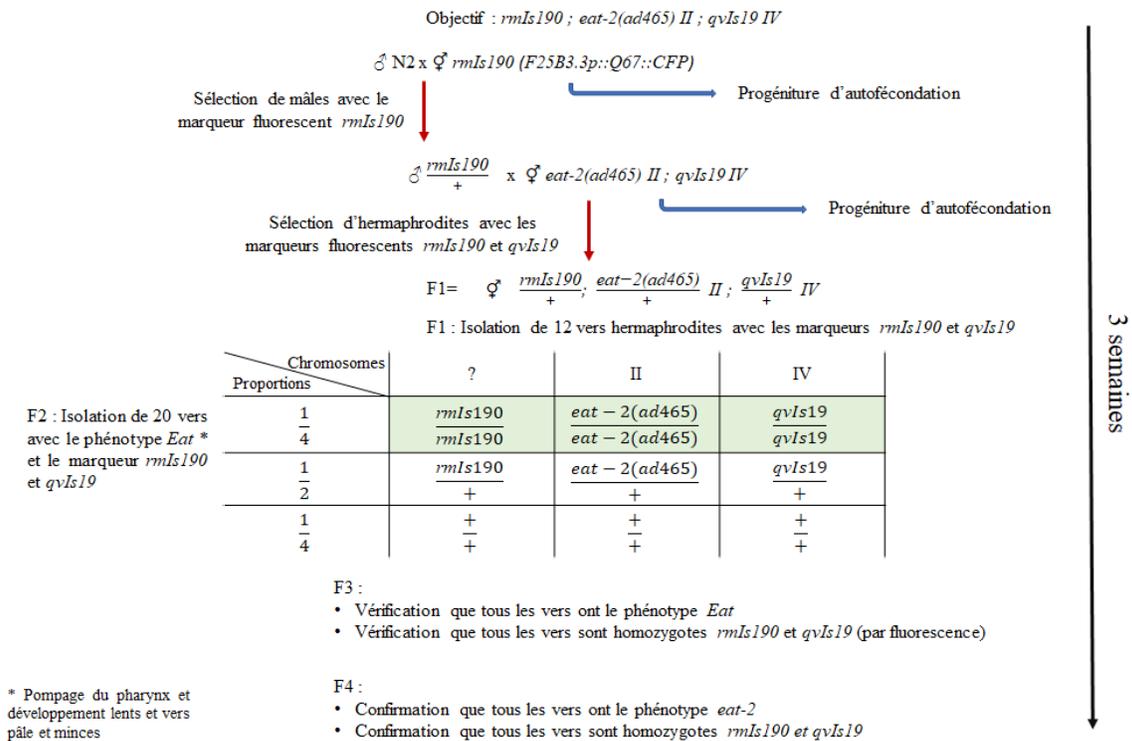


Figure 2.1 Exemple des étapes de construction d'une souche par génétique classique chez *C. elegans*. Le génotype souhaité est indiqué en vert. Les flèches rouges indiquent la progression au fil des générations, à différentes phases de ce croisement. Les flèches bleues indiquent la progéniture issue de l'autofécondation qui n'est pas d'intérêt lors de la construction d'une nouvelle souche, mais qui sera également retrouvée sur la plaque.

Évidemment, les croisements ne sont pas aussi simples en pratique. Beaucoup de mutations ne présentent pas de phénotypes et doivent être identifiées par PCR ou à l'aide de marqueurs fluorescents. Parfois, les mutations désirées sont sur le même chromosome, ce qui diminue drastiquement les chances d'obtenir des vers qui portent toutes les mutations souhaitées, d'autant plus si celles-ci sont proches l'une de l'autre sur un même chromosome. Dans ce cas, plusieurs stratégies peuvent être entreprises, ayant pour but d'augmenter la probabilité d'obtenir les mutants

d'intérêt. Par exemple, dans le cas de la construction de la souche VQ1943 [*sod-1(rt451) eat-2(ad465) II ; nuIs25 III*], les gènes *sod-1* et *eat-2* sont tous les deux situés sur le chromosomes II et seule la mutation *eat-2(ad465)* présentent un phénotype uniquement lorsque les vers sont homozygotes pour cette mutation. La stratégie adoptée était donc de croiser des mâles *sod-1(rt451)/+ II ; nuIs25 III* (antérieurement générés) avec des hermaphrodites *eat-2(ad465)* homozygotes, dans le but d'obtenir des vers F1 *sod-1(rt451)/eat-2(ad465) II ; nuIs25 III* puis d'identifier des vers F2 homozygotes pour *eat-2(ad465)* qui présentent le phénotype *Eat* et qui portent le marqueur fluorescent *nuIs25*. La progéniture de ces candidats (F3) a ensuite été testée par PCR afin d'identifier les plaques hétérozygotes pour la mutation *sod-1(rt451)* avec le raisonnement que si les vers sont homozygotes *eat-2(ad465) II* et qu'ils portent également la mutation *sod-1(rt451)* sur le chromosome II, c'est qu'il y a forcément eu recombinaison sur un des deux chromosome II. La progéniture du recombinant (F4) a ensuite été isolée afin d'identifier les vers homozygotes du chromosomes II recombiné, porteur des mutations *sod-1(rt451) eat-2(ad465) II*, puis les vers homozygotes pour le marqueur fluorescent *nuIs25* ont facilement pu être identifiés en vérifiant que tous les vers sur les plaques étaient fluorescents pour le marqueur *nuIs25* (Figure 2.2).

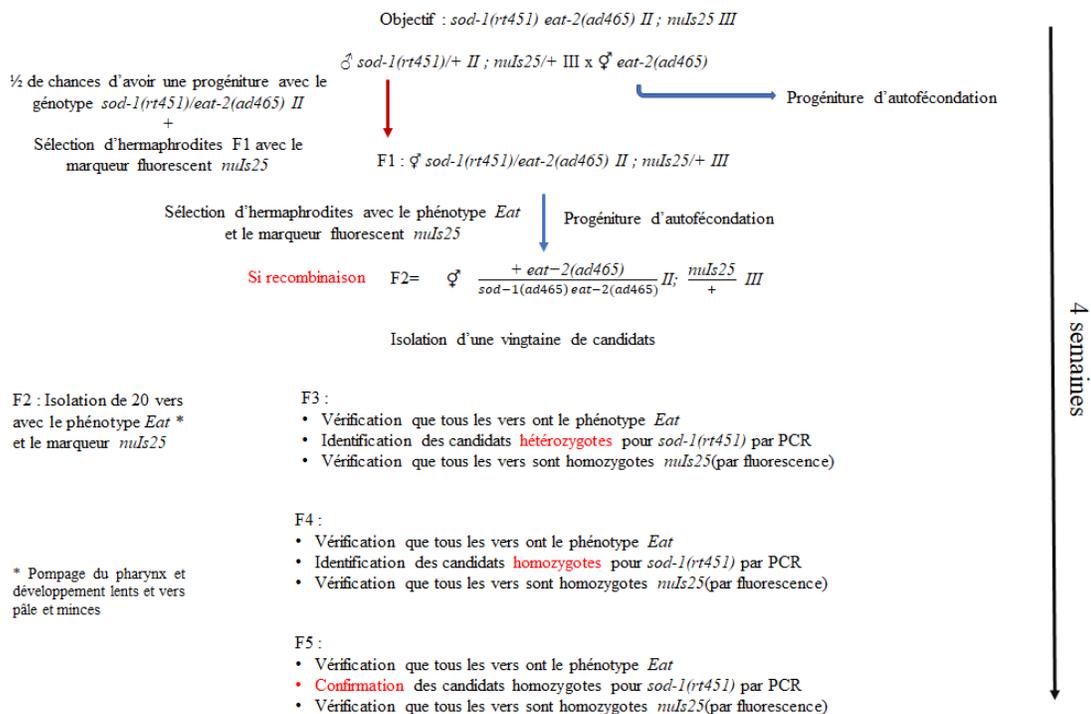


Figure 2.2 Exemple des étapes de construction d'une souche chez *C. elegans* lorsque que les deux loci génétique d'intérêt se trouvent sur le même chromosome. Dans ce cas, on doit chercher un chromosome

recombinant issu de recombinaison génétique lors de la méiose chez une hermaphrodite hétérozygote. Les flèches rouges indiquent la progression aux phases de croisement. Les flèches bleues indiquent la progéniture issue de l'autofécondation qui n'est pas d'intérêt lors de la construction d'une nouvelle souche, mais qui sera également retrouvée sur la plaque.

2.3 Construction d'amorces

Les mutations ponctuelles des mutants *eat-2(ad465)* et *sod-1(rt451)* ont été identifiées grâce à des PCR super-sélective ou des PCR SNP (*single nucleotide polymorphisms*), respectivement. Ces deux types de PCR nous ont permis d'identifier les mutants qui présentent des mutations ponctuelles.

PCR SNP : Deux caractéristiques importantes des amorces discriminantes sont à souligner. Tout d'abord, le nucléotide 3' de l'amorce se trouve au niveau de la mutation ponctuelle, indiqué comme position 0, et s'apparie avec le SNP à détecter, mais présente un mésappariement avec le nucléotide de l'autre allèle. Par conséquent, les amorces spécifiques aux allèles mutant et sauvage ont des bases différentes à leur extrémité 3'. Deuxièmement, deux bases en amont de la position du SNP, indiquée comme position -2, un changement supplémentaire est introduit dans le but de créer un deuxième mésappariement qui perturberait l'hybridation de l'amorce s'il y a déjà mésappariement au niveau de la position 0. L'amorce commune quant à elle est identique aux deux allèles et ne présentent pas de caractéristiques spécifiques (Figure 2.3 ; Chen et Schedl, 2021).

PCR super-sélective : Pour détecter la présence de mutations ponctuelles, Touroutine et Tanis (2020) ont développé la technique de la PCR super-sélective (SS-PCR). Une amorce SS est composée d'une séquence d'ancrage en 5' de taille variable et qui s'hybride complètement à l'ADN matrice, suivie d'une séquence dite « pont » de 7 à 14nt non complémentaire et d'une courte séquence d'environ 6nt, appelée « pied » en 3', complémentaire à la séquence allélique cible (Touroutine et Tanis, 2020). Le nucléotide « discriminant » en 3' du pied de l'amorce super-sélective diffèrent évidemment entre les allèles mutant et sauvage. L'amorce commune, tout comme pour la PCR SNP, reste la même (Figure 2.3).

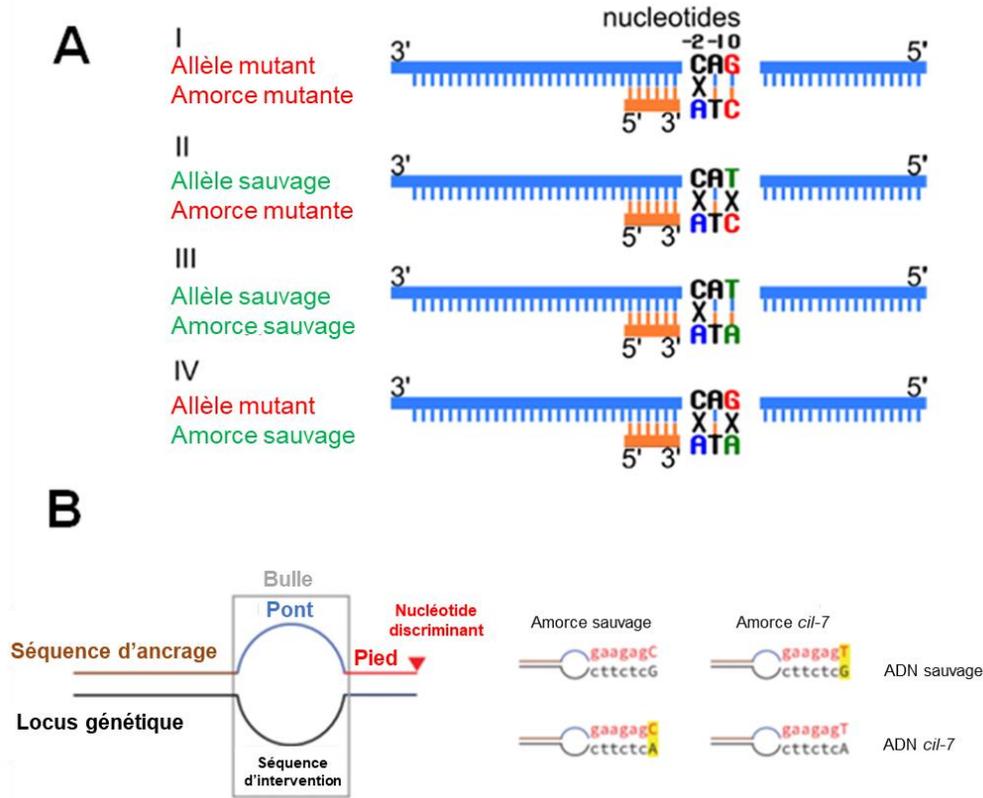


Figure 2.3 Schémas des techniques de PCR utilisées pour le génotypage lors de la construction de souches. **A.** Schéma montrant la stratégie de conception d'amorces pour discriminer entre les allèles variant et sauvage par SNP-PCR (*Single Nucleotide polymorphism PCR*). Adapté de Chen et Schedl, 2021. **B.** Droite : Schéma montrant comment s'hybrident les amorces SS (*Super Selective*) à l'ADN matrice. Gauche : Quatre schémas d'hybridation pour illustrer des amorces SS utilisées pour détecter le type sauvage et l'allèle mutant *cil-7(gk688330)*. Les mésappariements sont surlignés en jaune. Adaptée de Touroutine et Tanis, 2020.

2.4 ARN interférence

Principe et description du système : Dans le cadre des expériences d'ARN interférence (ARNi), la souche bactérienne HT115(DE3) a été utilisée, conformément aux travaux de Timmons et Fire en 1998. Cette souche présente dans son génome une résistance à la tétracycline et le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur "Lac", inductible par IPTG. Par conséquent, la sélection de la souche bactérienne appropriée s'effectue à l'aide de la tétracycline. De plus, cette souche présente une mutation dans le gène codant pour la ARNase III, ce qui empêche l'enzyme de dégrader les ARN double brin transcrits, afin d'interférer efficacement avec l'expression des gènes cibles des vers. Ces bactéries sont ensuite transformées avec le plasmide qui comprend la séquence spécifique d'un gène de *C. elegans* insérée entre deux promoteurs de l'ARN polymérase T7, positionnés de part et d'autre du gène d'intérêt. Cette disposition favorise une transcription bidirectionnelle du gène, donnant lieu à la formation de l'ARNdb correspondant

(Kamath *et al.*, 2001; Timmons *et al.*, 2001). De plus, le plasmide utilisé pour l'ARNi, « L4440 », possède également dans son squelette, une séquence de résistance à l'ampicilline, assurant ainsi la sélection des bactéries transformées.

Le plasmide L4440 vide, appelé "EV" pour "vecteur vide" (*empty vector* ; Andersen *et al.*, 2008; Timmons L. et Fire A., 1998) est également utilisé à titre de contrôle. Ce plasmide vide ne renferme pas d'insert de gène de *C. elegans*.

Après avoir transféré les vers sur les plaques contenant les bactéries transformées, celles-ci sont ingérées et digérées par les vers et l'ARNdb sera importé par les cellules intestinales, puis propagé aux autres cellules, via un transporteur d'ARNdb, SID-1 (Feinberg et Hunter, 2003). L'ARNdb sera dans un premier temps coupé en petit ARN interférents (ARNpi) par DICER puis, rejoint par le complexe RISC qui va utiliser l'un des deux brins de l'ARNpi comme guide pour trouver l'ARNm correspondant au gène cible qui sera ensuite clivé et dégradé, empêchant ainsi sa traduction et inhibant donc l'expression du gène cible.

Les clones bactériens utilisés pour les expériences d'ARNi sont listés au tableau 2.3.

***drl-1* ARNi** : Le plasmide contenant la séquence correspondant au gène *drl-1* nous a été envoyé de la part de Dr. David Wang (*Washington University in St-Louis*, États-Unis). Reçu sur du papier Whatman, nous l'avons incubé dans un tube de 1.5 mL avec 100 µL de tampon Tris-EDTA durant 15 min. Le tube a ensuite été centrifugé et 10 µL de surnageant ont été transformés dans des bactéries *E. coli* DH10B compétentes pour amplification et vérification par séquençage, puis transformation ultérieure dans des bactéries HT115 compétentes.

ARNi des gènes d'autophagies (*lgg-1/GABARAP*, *cup-5/TRPML1*, *atg-7/ATG7*, *atg-13/ATG13*, *vha-13/ATP6VIA*, *vha-15/ATP6VIH*) : Des précultures liquides de clones bactériens (HT115) contenant chacun un plasmide ciblant un gène différent ont été obtenus de la bibliothèque Ahringer (accessible au laboratoire du Dr. S. Hekimi, Université McGill). Les plasmides ont été extraits via le kit « *Plasmid DNA Miniprep Kit*, Biobasic », en suivant le protocole inclus dans le kit, puis envoyés à séquencer pour vérification d'identité à « Génome Québec », en utilisant l'amorce mhl-

39 (5' GAGGAAGCAACCTGGC 3'). Les bactéries contenant les séquences correctes des inserts de gènes ciblés pour les expériences d'ARNi ont été stockés à -80 °C avec du glycérol.

Pour la préparation des cultures pour les expériences d'ARNi, les clones d'intérêt (stockés à -80 °C) ont été décongelés et étalés sur des plaques de Pétri contenant du LB-Agar mélangé à de l'ampicilline à 75 µg/mL (sélection du plasmide) et de la tétracycline à 12,5 µg/mL (Timmons *et al.*, 2001; Wang et Barr, 2005). Ensuite, ces clones bactériens ont été incubés dans une boîte opaque, à 37 °C pendant environ 18 h. Par la suite, pour chaque clone bactérien, une colonie est choisie, piquée et placée dans 1 à 3 mL de LB supplémenté de 75 µg/mL d'ampicilline et de 12,5 µg/mL de tétracycline et cultivée à 37 °C entre 15 à 16 h avec une agitation de 200 rpm. 100 µL de chaque clone sont ensuite prélevés des précultures et ajoutés dans des tubes à centrifugeuses de 50 mL, avec 15 mL de LB supplémenté de 75 µg/mL d'ampicilline puis cultivées pendant 14 à 15 h, à 37 °C et 200 rpm. Suite à cette incubation, 1 mM d'IPTG a été ajouté aux cultures puis remis dans l'incubateur à agitation (200 rpm) à 37 °C pendant 1 h supplémentaire. Les bactéries ont ensuite été concentrées via centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min à une température de 4 °C (centrifugeuse Avanti J-E Beckman Coulter, rotor JA-17). Le surnageant a été retiré pour ne laisser qu'environ 1 mL de LB et le culot bactérien a été resuspendu. Finalement, ces bactéries concentrées ont été étalées sur des plaques NGM/IPTG/ampicilline fraîchement préparées (voir ci-dessous), avec un volume de 100 µL de bactérie sur chaque plaque, puis, incubées à 20 °C pendant 24 à 48 h, dans une boîte opaque, avant d'y déposer les vers.

Préparation des plaques NGM/IPTG/ampicilline pour l'ARNi : Les plaques NGM ont été supplémentées d'un mélange de 75 µg/mL d'ampicilline et de 1 mM d'IPTG puis conservées à température ambiante dans une boîte opaque, jusqu'à ensemencement.

Stade des nématodes : Pour toutes les expériences d'ARNi, les vers mis sur les plaques étaient des hermaphrodites adultes remplies d'embryons. La progéniture a ensuite été transférée de plaques chaque deux jours jusqu'au jour 3 de l'âge adulte pour les expériences d'ARNi des gènes d'autophagie (*lgg-1*, *cup-5*, *atg-7*, *atg-13*, *vha-13*, *vha-15*) et jusqu'au jour 5 et 10 pour l'expérience d'ARNi de *drl-1*.

Tableau 2.3 Liste des clones bactériens utilisés pour les expériences d'ARNi.

Transcrits	Gènes	Bactéries	Références
L4440		HT115(DE3)	Timmons et Fire, 1998 ; Timmons <i>et al.</i> , 2001)
Y106G6A.1	<i>drl-1</i>	HT115(DE3)	Sandoval <i>et al.</i> , 2019
C32D5.9	<i>lgg-1</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)
R13A5.1	<i>cup-5</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)
M7.5	<i>atg-7</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)
D2007.5	<i>atg-13</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)
Y49A3A.2	<i>vha-13</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)
T14F9.1	<i>vha-15</i>	HT115(DE3)	Kamath et Ahringer (2003)

2.5 Tests de paraquat

Des vers de stade L4 ont été soumis à différentes concentrations de paraquat : 0.5 mM, 1 mM et 2.5 mM. Respectivement, des volumes de 11.25 μ L, 22.5 μ L et 56.25 μ L de paraquat (200 mM) ont été diffusés sur des plaques contenant 4.5 mL de NGM. 100 μ L de bactéries *E. coli* OP50 (concentrées 5 fois) ont été ajoutés 12 heures plus tard. Des vers de stade L4 ont été transférés sur les plaques de paraquat 24 heures après. Les vers ont ensuite été exposés au paraquat durant une nuit et incubés à 20 °C, dans une boîte opaque. Le lendemain, les vers (jour 1 de l'âge adulte) ont été examinés et visualisés au microscope pour étudier la neurodégénérescence ou 48 heures plus tard pour déterminer leur pourcentage de survie (Figure 3.1A).

2.6 Tests de motilité

Nous avons mesuré la motilité des modèles de la maladie de Huntington en mettant les vers dans un milieu liquide (M9) et en comptant manuellement le nombre de battements effectués par minute ("*thrashing assay*" ; Figure 3.4A). Afin de ne pas biaiser les résultats, l'évaluation de la locomotion a été faite de manière impartiale sans connaissance préalable du génotype des animaux observés, jusqu'à la fin de toutes les analyses. Les animaux ont été mis dans des gouttes de 30 μ L de M9 sur une lame de microscope et un battement a été comptabilisé chaque fois que la tête du ver traverse la ligne médiane verticale du corps et revient à son emplacement initial, pour une durée de 60 secondes. 60 vers ont été testés pour chaque génotype et leur âge correspondait au jour 5 de l'âge adulte.

2.7 Microscopie

Toutes les souches ont été maintenues à 20 °C et nourries *ad libitum* pendant au moins trois générations avant leur observation. L'âge adulte des vers est déterminé comme suit : l'âge « jour 1 » correspond à 24 heures post-stade larvaire L4, l'âge « jour 2 » correspond à 48 heures post-stade L4, etc.

Les vers ont été immobilisés avec de l'azide de sodium (75 mM) sur une couche d'agarose 5 %, puis recouverts d'une lamelle 25 mm x 25 mm (indice de diffraction $n_e=1.525$). L'observation des vers s'est faite au microscope à fluorescence AxioImager M2 (Zeiss) et les images ont été acquises avec la caméra AxioCam (Zeiss) et traitées avec le logiciel AxioVision (Zeiss). Le traitement post-expérimental des images a été effectué à l'aide du logiciel ImageJ.

Visualisation du système nerveux : Tous les vers ont été observés en vue latérale, sauf indication contraire. Les neurones ont été observés grâce à des rapporteurs transgéniques stables intégrés dans le génome des vers, exprimant une protéine fluorescente spécifiquement dans des types neuronaux étudiés (tableau 2.1). Certaines observations de neurones chimiosensoriels ce sont faites aussi avec des colorants lipophiles dits DiI (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) et DiO (3,3'-DiocadecylOxcarbocyanine perchlorate).

Marquage de neurones sensoriels par coloration lipophile : La coloration DiI (neurones en rouge ; Figure 3.2A et C) ou DiO (neurones en vert ; Figure 3.3C) permet un marquage de huit paires de neurones sensoriels : les amphides (ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB) et les phasmides (PHA and PHB ; Hedgecock *et al.*, 1985). Un volume de 75 μ L de DiO/DiI dilué à 40 μ g/mL dans du tampon M9 a été déposé pendant une heure sur une plaque contenant des modèles de sclérose latérale amyotrophique (jour 1 d'âge adulte) précédemment exposé au paraquat. Les vers ont par la suite été transférés sur une nouvelle plaque pendant 30 minutes avant l'observation. L'absence d'absorption du colorant par ASH et/ou PHA et PHB a été quantifiée comme défaut.

Visualisation et analyse des neurones cholinergiques : Nous avons croisé les modèles de sclérose latérale amyotrophique avec le marqueur spécifique des neurones cholinergiques *vsIs48 (unc-17p::GFP)* pour évaluer la perte neuronale (Figure 2.4). Les neurones cholinergiques de la corde nerveuse ventrale (jour 1 de l'âge adulte) ont été visualisés et comptés sous les objectifs x40 et x63 afin de confirmer ou infirmer la neurodégénérescence cholinergique (basée sur l'absence de GFP au niveau des somas) après exposition au paraquat.

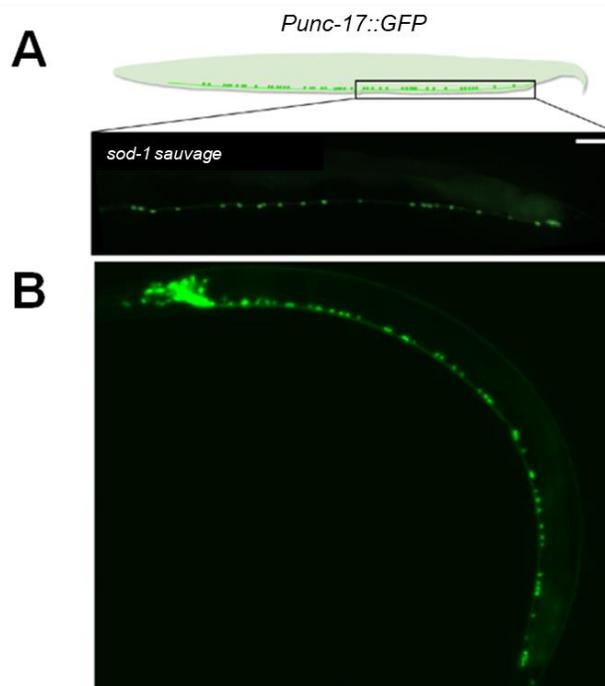


Figure 2.4 Illustration des neurones cholinergiques de *C. elegans*. **A.** Illustration schématique (en haut) et image représentative (en bas) des neurones cholinergiques situés le long de la corde ventrale et dans la région du corps postérieure à la vulve. **B.** Les neurones moteurs cholinergiques ont été visualisés à l'aide du rapporteur fluorescent *Punc-17::GFP*. Les animaux ont été testés pour la neurodégénérescence après une

exposition au stress oxydatif induit par 2.5 mM de paraquat, au jour 1 de l'âge adulte. Figure A adaptée de Boskuylu *et al.*, 2018

Visualisation et analyse du neurone ASH : Les modèles de maladie de Huntington et de sclérose latérale amyotrophique ont été croisés avec le marqueur *qvIs19* (*Psra-6::DsRed* ; Figure 2.5A) et observés à x40 afin d'examiner plusieurs phénotypes reliés au neurone glutamatergique ASH. La neurodégénérescence, le perlage des dendrites du neurone ASH (suite à l'exposition au paraquat ; Figure 2.5B) ainsi que l'accumulation de la queue polyglutamique (Figure 2.5C) ont été étudiés (jour 1 et 3 de l'âge adulte pour les modèles de sclérose latérale amyotrophique et maladie de Huntington, respectivement).

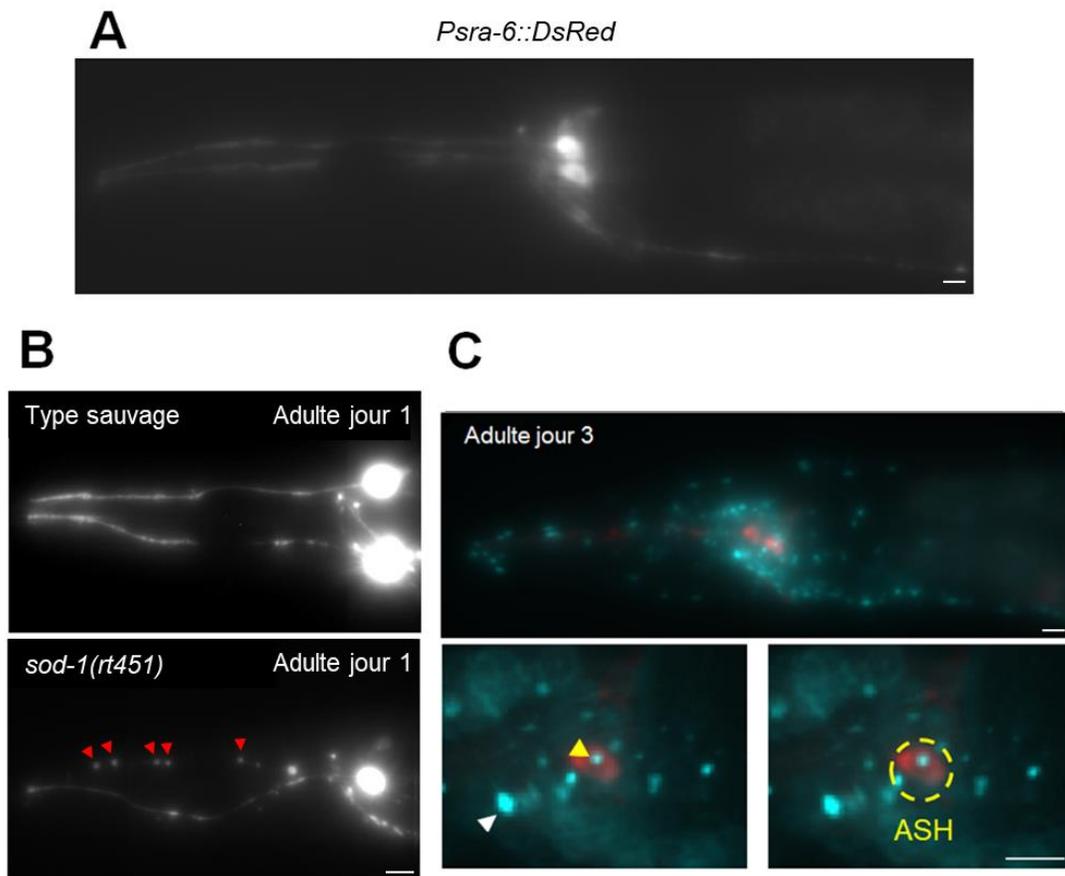


Figure 2.5 Visualisation du neurone sensoriel ASH avec le rapporteur fluorescent *Psra-6::DsRed*. **A.** Visualisation du neurone sensoriel ASH avec le rapporteur fluorescent *Psra-6::DsRed*. **B.** Visualisation des dendrites du neurone ASH, au jour 1 de l'âge adulte. En haut, des dendrites intactes chez les vers de type sauvage. En bas, des dendrites présentant un perlage dendritique (triangles rouges) de vers mutants *sod-1(rt451)*, après exposition au stress oxydatif par paraquat (1 mM). **C.** Visualisation d'agrégats de la queue polyglutamique mutée (polyQ67) au jour 3 de l'âge adulte. La polyQ67 a été visualisée avec le rapporteur

F25B3.3p::Q67::CFP à l'extérieur (triangle blanc) et à l'intérieur (triangle jaune) du neurone ASH (cercle en pointillés jaune). Échelle = 10 μ m.

Visualisation et analyse des neurones mécanosensoriels : Les modèles de maladie de Huntington ont été croisés avec le marqueur des neurones mécanosensoriels *jsIs973 (Pmec-7::mRFP)* afin d'examiner leur morphologie au jour 3 et 5 de l'âge adulte (Figure 3.7A et B). Les phénotypes observés étaient les suivants : neurone allongé, fluorescence faible, présence d'accumulation de polyglutamine dans le neurone et absence de neurone.

Quantification des agrégats de polyglutamine : L'observation des agrégats de polyglutamine a été réalisée grâce aux marqueurs *rmIs172(F25B3.3p::PolyQ19::CFP)* et *rmIs190(F25B3.3p::PolyQ67::CFP)*, qui expriment la queue polyglutamique de manière pan-neuronale (Figure 3.5A).

La quantification de la taille des agrégats de polyglutamine a été réalisée suivant les mêmes critères pour tous les génotypes : même nombre d'image par stade de ver et traitement d'image fixe (images en format 8-bit, soustraction de l'arrière-plan de la tête et respect d'un seuil établi à partir des agrégations les plus fortes pour éviter la saturation et ce, pour toutes les images). Un nombre minimum de n = 60 animaux a été examiné pour chaque génotype et les vers ont été observés au jour 3 de l'âge adulte.

Pour l'accumulation de la queue polyglutamique (polyQ(n)) dans les neurones individuels, le nombre d'agrégats a été quantifié grâce à la fonction « *Analyze particles* » de ImageJ. Le neurone ASH et les neurones mécanosensoriels AVM, ALM, PVM et PLM ont été étudiés grâce aux marqueurs *qvIs19* et *jsIs973*, respectivement. Les images acquises avec les canaux spécifiques aux marqueurs neuronaux et aux agrégats de polyglutamine ont été superposés et l'accumulation de polyQ(n) intraneuronale a été comptabilisée uniquement lorsque les neurones et les agrégats étaient sur le même plan. Un nombre minimum de n = 60 animaux a été examiné pour chaque génotype et les vers ont été observés au jour 3 et au jour 5 de l'âge adulte.

2.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8. Les données des figures sont exprimées en proportion \pm erreur standard ou en moyenne \pm erreur standard. Afin

d'analyser les proportions, des tests de Fishers ont été effectuées et les valeurs-p ont été ajustées pour comparaisons multiples (correction Bonferroni). Les comparaisons entre deux moyennes ont été faites avec des tests de Student, et des analyses par ANOVA à un facteur pour plus de deux moyennes si les conditions (normalité des résidus, l'homogénéité des variances) étaient respectées. Les valeurs-p ont été considérées significatives lorsque $< 0,05$ (*), $0,01$ (**) ou $0,001$ (***)

CHAPITRE 3

Résultats

3.1 Résultats obtenus sur le modèle de la maladie de la sclérose latérale amyotrophique

3.1.1 Étude de l'effet de la restriction calorique sur la sensibilité au stress oxydatif chez un modèle de sclérose latérale amyotrophique

De multiples études ont établi que chez plusieurs espèces les modèles de sclérose latérale amyotrophique sont hautement vulnérables au stress oxydatif (Baskoylu *et al.*, 2018 ; Cunha-Oliveira *et al.*, 2020 ; Hemerková et Vališ, 2021). Chez *C. elegans*, un moyen d'induire le stress oxydatif est l'utilisation de paraquat. Le paraquat (PQ²⁺, dont le nom systématique est *N,N'*-diméthyl-4,4'-bipyridinium dichloride) est un herbicide qui dérobe les électrons des molécules environnantes, ce qui induit leur oxydation et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant un stress oxydatif chez l'organisme (Chen *et al.*, 2021 ; Alizadeh *et al.*, 2022). Pour tester l'effet de la restriction calorique sur un modèle de sclérose latérale amyotrophique soumis à un stress oxydatif accru, j'ai d'abord construit des souches de fonds génétiques de type sauvage et mutant pour *eat-2(ad465)*, portant la mutation *sod-1(rt451)*, qui est un modèle de sclérose latérale amyotrophique. J'ai ensuite soumis des vers ces diverses souches à différentes concentrations de paraquat (0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM ; Figure 3.1A). Les vers ont été exposés au paraquat à partir du stade larvaire 4 (L4), puis j'ai mesuré leur pourcentage de survie après 48 heures d'exposition (Figure 3.1B).

Les vers de type sauvage et mutants *eat-2(ad465)* ne présentaient pas de sensibilité notable au paraquat. Les mutants *sod-1(rt451)*, quant à eux, démontraient bel et bien une vulnérabilité évidente au paraquat mais celle-ci était moins accentuée que chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* (Figure 3.1B). En effet, les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* exhibaient une sensibilité accrue au stress oxydatif et présentaient des pourcentages de survie plus faibles à toutes les concentrations testées (Figure 3.1B). La tendance est vraie à toutes les concentrations, et devient significative surtout à la plus forte concentration de paraquat ($p=0.14$ pour 0.5 mM à $p<0,001$ à 2.5 mM). Ces résultats indiquent que la restriction calorique exacerbe la sensibilité au stress oxydatif chez les modèles de sclérose latérale amyotrophique.

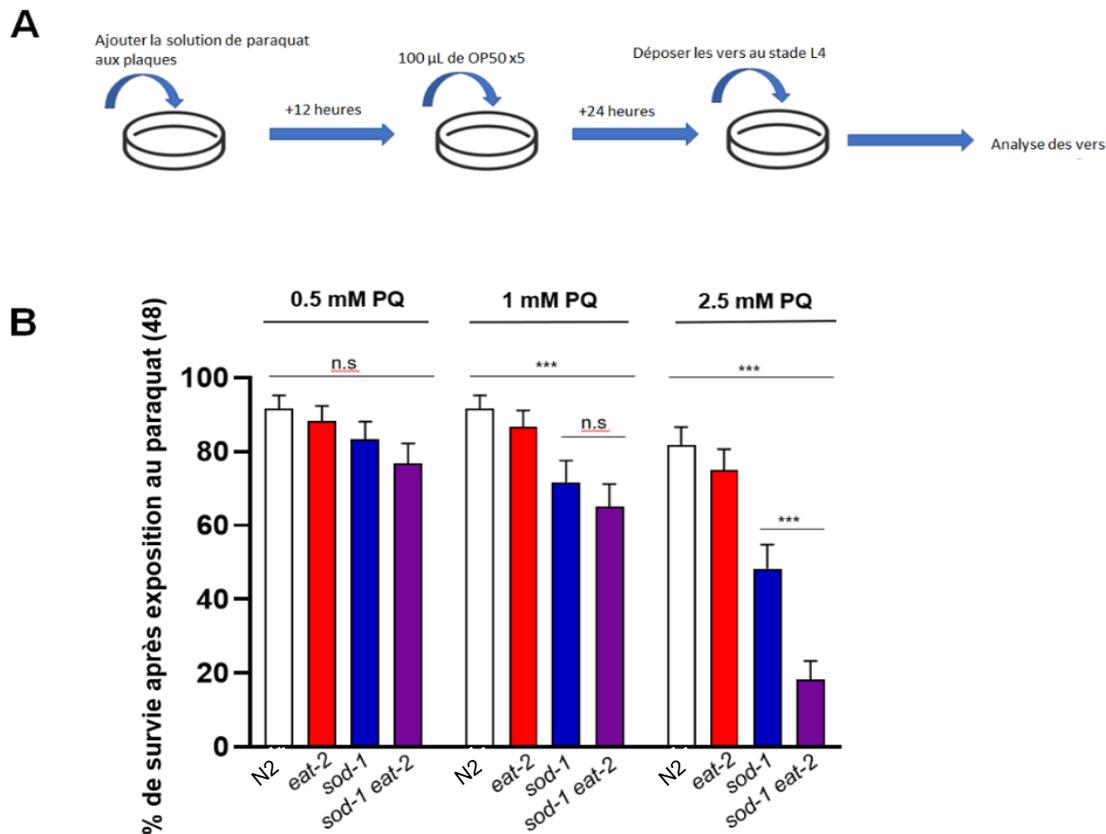


Figure 3.1 Résultats des expériences de survie des vers suite à une exposition au stress oxydatif par paraquat (PQ; 0.5 mM, 1 mM et 2.5 mM) chez les vers de type sauvage (N2), les simples mutants *eat-2(ad465)* et *sod-1(rt451)*, et les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*. **A.** Schéma représentant les étapes des expériences de survie au stress oxydatif. **B.** Graphique représentant le pourcentage de survie des vers après 48 heures d'exposition au paraquat (proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; ns : non significatif). $N \geq 60$ pour chacun des génotypes dans toutes les conditions.

3.1.2 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les défauts des neurones chez un modèle de sclérose latérale amyotrophique

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la vulnérabilité au stress oxydatif chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* s'observait aussi au niveau du système nerveux des vers. Baskoylu *et al.* (2018) ont précédemment publié que les mutants *sod-1(rt451)*, suite à une exposition au paraquat, présentaient des altérations des neurones moteurs cholinergiques (rapportée comme étant une neurodégénérescence), ainsi que des défauts des neurones chimiosensoriels ASH (situés dans la tête) et des neurones PHA et PHB (situés dans la queue), car ces neurones n'absorbent pas le colorant DiI (rapporté comme étant de la neurodégénérescence par les auteurs). J'ai donc testé l'effet de paraquat sur ces 2 types de neurones, en utilisant les marqueurs fluorescents,

stables car intégrés dans le génome, tel que décrit ci-dessous. Comme pour les expériences de survie de la section 3.1.1, j'ai exposé les souches de types sauvage et mutantes, de stade L4, aux concentrations de paraquat antérieurement testées (0,5 mM, 1 mM, 2.5 mM).

Pour les neurones cholinergiques, j'ai utilisé le rapporteur fluorescent *vsIs48 (Punc-17::gfp)* et j'ai donc construit des souches de fonds génétiques de type sauvage et mutant pour *eat-2(ad465)*, portant la mutation *sod-1(rt451)*, qui est un modèle de sclérose latérale amyotrophique et le rapporteur fluorescent *vsIs48 (Punc-17::gfp)*. Contrairement aux résultats de Baskoylu *et al.* (2018), mes analyses rigoureuses et détaillées n'ont pas révélé de différences au niveau des neurones cholinergiques chez les vers de type sauvage *vsIs48*, les simples mutants *eat-2(ad465); vsIs48* ou *sod-1(rt451); vsIs48*, ni chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465); vsIs48*. De plus, malgré l'exposition des vers à la concentration la plus élevée de paraquat (2.5 mM), aucune perte significative de neurones cholinergiques n'a été notée, chez aucune des souches sauvages et mutantes. Je tiens à préciser ici que l'utilisation d'un marqueur, comme *vsIs48*, de tous les neurones cholinergiques à la fois (environ 120 neurones dans la corde ventrale et les ganglions de la tête du ver) n'offre pas assez de résolution. Cette densité des neurones cholinergiques au niveau de la tête rend leur compte infaisable. De plus, la disposition des neurones cholinergiques de la corde ventrale varie considérablement d'un ver à l'autre, rendant impossible leur quantification exacte. Je n'ai donc pas poursuivi cette analyse.

Pour l'observation des neurones glutamatergiques, nous avons d'abord utilisé le colorant fluorescent rouge et lipophile DiI (Figure 3.2A et C). Dans la tête et la queue de *C. elegans*, des neurones sensoriels glutamatergiques sont exposés à l'environnement, ce qui permet au colorant de s'insérer dans la membrane exposée de ces neurones. En conditions normales (c'est à dire sans paraquat), j'ai pu documenter que pratiquement tous les neurones ASH, PHA et PHB sont colorés quand les animaux sont en présence de DiI, chez le type sauvage, les simples mutants *eat-2(ad465)* ou *sod-1(rt451)*, ou les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* (Figure 3.2B et D).

J'ai ensuite exposé ces souches au paraquat et comptabilisé le pourcentage de vers qui présentent des défauts d'absorption de DiI par les neurones. Pour toutes les concentrations testées de paraquat, j'ai observé que l'absorption de DiI n'était pas compromise chez les vers de types sauvages et les mutants *eat-2(ad465)* (Figure 3.2B et D). Cependant, les neurones ASH, PHA et PHB des mutants

sod-1(rt451) et *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*, ont montré des défauts d'absorption de DiI, avec une plus grande proportion chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* (Figure 3.2B et D). Ces résultats n'ont fait que souligner l'effet défavorable de la restriction calorique chez les modèles de sclérose latérale amyotrophique.

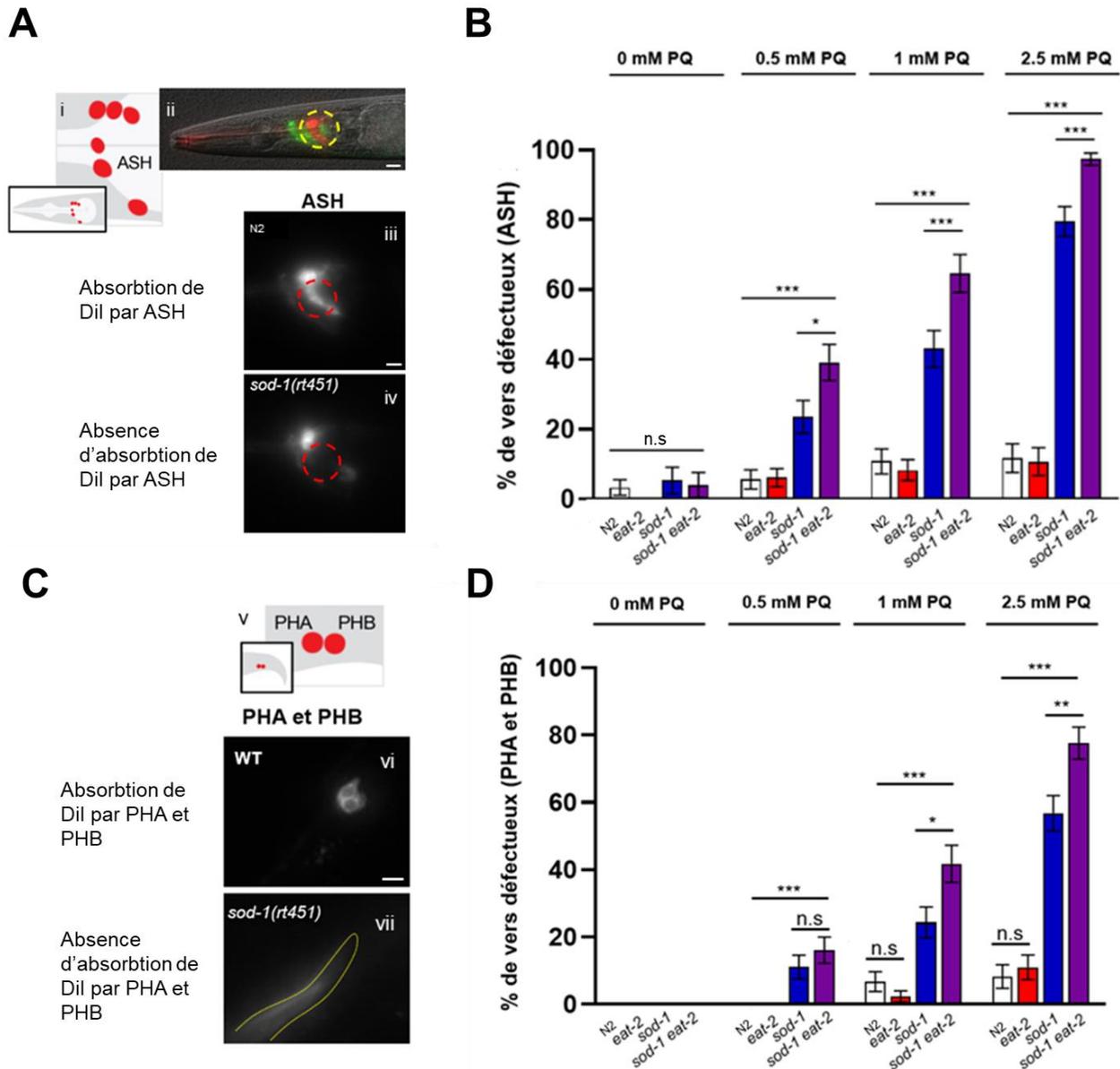


Figure 3.2 Résultats de la visualisation des neurones ASH (A), PHA et PHB (C) avec le colorant DiI, suite à l'exposition au paraquat (0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM) chez les vers de type sauvage (N2), les simples mutants *eat-2(ad465)* et *sod-1(rt451)*, et les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* au jour 1 de l'âge adulte. A. i) Schéma représentant les neurones chimiosensoriels de la tête, dont ASH, marqués par DiI (adapté de Baskoylu *et al.*, 2018). ii) Image représentant la coloration des neurones chimiosensoriels par DiI (cercle en pointillés jaunes). iii) Neurones chimiosensoriels colorés par DiI chez le type sauvage après exposition au

paraquat. **iv)** Neurones chimiosensoriels colorés par DiI chez les mutants simples *sod-1(rt451)* après exposition au paraquat. Le cercle en pointillés rouges indique la présence ou l'absence de coloration du neurone ASH. **B.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec des défauts de coloration de ASH, suite à une exposition au paraquat. **C. v)** Schéma représentant les neurones chimiosensoriels de la queue PHA et PHB, marqué par DiI (adapté de Baskoylu *et al.*, 2018). **vi)** Neurones chimiosensoriels PHA et PHB colorés par DiI chez le type sauvage après exposition au paraquat. **vii)** Neurones chimiosensoriels PHA et PHB colorés par DiI chez les mutants simples *sod-1(rt451)* après exposition au paraquat. Les pointillés jaunes délimitent la queue du ver. **D.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec des défauts de coloration des neurones PHA et PHB, suite à une exposition au paraquat (proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs p-ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; ns : non significatif). Échelle = 10 μ m. $N \geq 60$ pour chacun des génotypes dans toutes les conditions.

3.1.3 Défauts du neurone ASH chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique

L'absence d'absorption du colorant DiI par les neurones chimiosensoriels ASH, PHA et PHB chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique *sod-1(rt451)* suggère des défauts au niveau de ces neurones. Cependant, contrairement aux hypothèses de Baskoylu *et al.* (2018), ces défauts de coloration ne sont pas forcément dus à une neurodégénérescence. L'absence d'absorption de DiI par les neurones ASH, PHA et PHB peut être liée à (i) des défauts structuraux ou (ii) à l'absence du neurone en tant que tel. Dans le but de mieux comprendre les raisons de la perte d'absorption du colorant DiI, nous avons utilisé le rapporteur fluorescent *Psra-6::DsRed*, encodé génétiquement. Ce rapporteur permet la visualisation du neurone de façon fiable, car cela ne dépend pas de l'exposition des dendrites du neurone à un colorant externe. J'ai donc généré des intégrants qui expriment ce rapporteur de façon stable (car le transgène a été inséré dans le génome). Un des intégrants, nommé *qvIs19(Psra-6::DsRed)*- a été utilisé pour construire les souches simples mutantes *sod-1(rt451); qvIs19* et *eat-2(ad465); qvIs19* puis, les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465); qvIs19*.

J'ai ensuite exposé des vers L4 de ces souches, pendant 14 heures, à des concentrations de 1 mM et 2.5 mM de paraquat, afin de déterminer si le neurone ASH était présent ou absent chez les vers de ces diverses combinaisons génétiques et exposés au paraquat. Aucun ver ne présentait de perte du neurone ASH, après exposition au paraquat et ce, même à la concentration la plus élevée, ce qui démontre bien que l'absence de coloration DiI n'était pas due à la neurodégénérescence, mais possiblement à un défaut structurel empêchant la coloration du neurone.

J'ai d'ailleurs noté une altération structurelle au niveau des dendrites du neurone ASH chez les modèles de sclérose latérale amyotrophique (Figure 3.3A et B). En effet, les dendrites paraissaient avoir un diamètre affaibli et présenter des varicosités ou un état de perlage. Ce défaut structurel pourrait être lié à l'absence d'absorption du colorant par le neurone ASH, PHA et PHB. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un autre colorant semblable au DiI, mais de couleur verte, nommé DiO, qui tout comme le DiI est absorbé par les neurones ASH, PHA et PHB. J'ai donc soumis les vers de types sauvage et mutants (stade L4), qui expriment le marqueur *qvIs19*, au paraquat (1mM et 2,5 mM) pendant environ 14 heures, puis je les ai ensuite exposés au colorant DiO. Après observation sous microscope de la fluorescence rouge (*qvIs19*) et de la fluorescence verte (DiO), j'ai superposé ces deux fluorescences pour évaluer la présence ou non de coloration, et comparer la structure du neurone (Figure 3.3C). De façon invariable, tous les vers dont le neurone sous étude n'était pas coloré, présentaient un perlage dendritique (en rouge ; Figure 3.3D). De plus, ces défauts dendritiques sont davantage présents chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*, de manière similaire aux résultats obtenus lors des expériences avec le colorant DiI. Ces résultats nous ont permis de conclure que l'absence de coloration de ASH, précédemment notée, est probablement due à des défauts structurels du neurones (perlage dendritique du neurone) et non pas à une absence du neurone. En revanche, le rapporteur *qvIs19* ne marque malheureusement pas les neurones PHA et PHB. Et donc les raisons de l'absence du colorant dans ces neurones restent à être étudiées. Cependant, l'hypothèse de neurodégénérescence de PHA et PHB semble improbable.

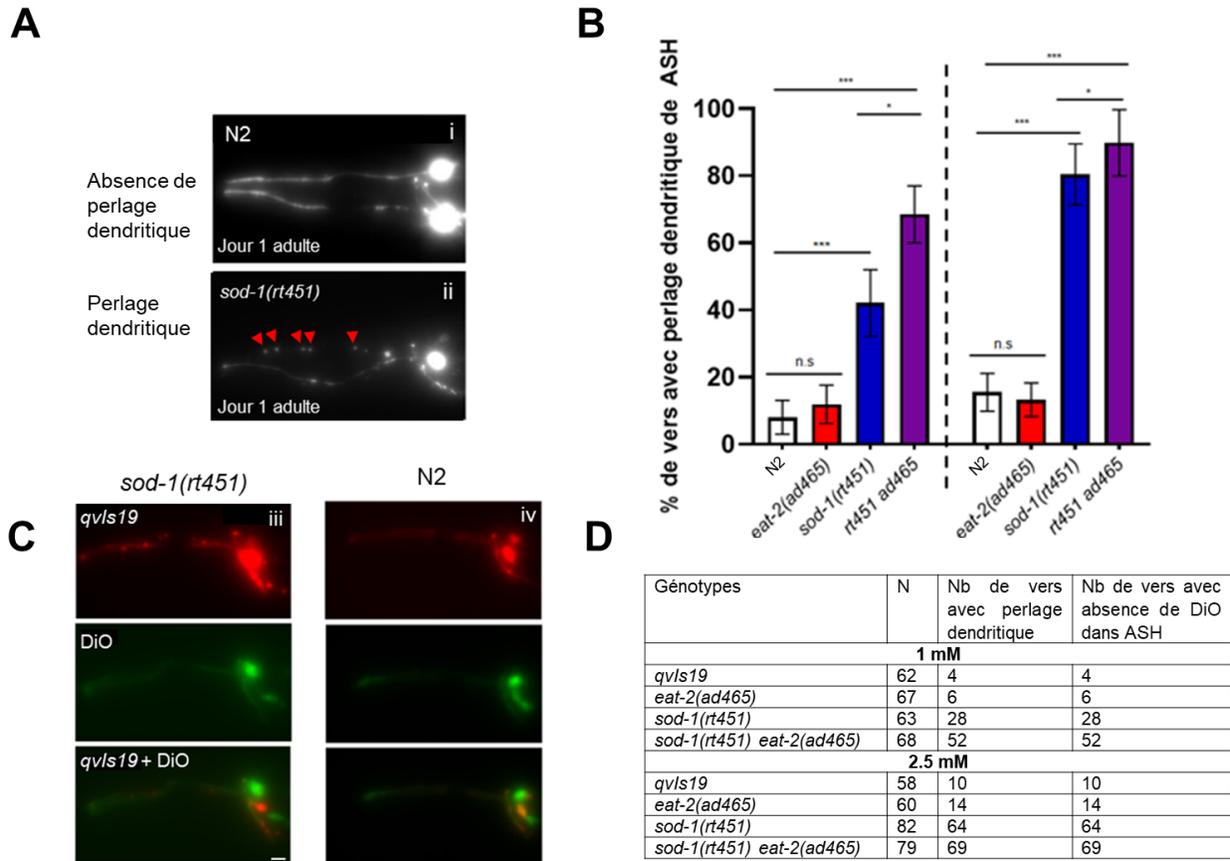


Figure 3.3 Observation simultanée du neurone ASH en utilisant le marqueur fluorescent *Psra-6::DsRed* et du colorant DiO. Résultats de la superposition de ces deux signaux fluorescents suite à l'exposition au paraquat (1 mM, 2.5 mM), chez les vers de type sauvage (N2), les simples mutants *eat-2(ad465)* et *sod-1(rt451)*, et les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*, au jour 1 de l'âge adulte. **A.** Visualisation des dendrites du neurone ASH avec le rapporteur fluorescent *Psra-6::DsRed*. **i)** des dendrites intactes de vers de type sauvage. **ii)** des dendrites présentant un perlage dendritique (cercle en pointillés rouges) de vers mutants *sod-1(rt451)* après exposition au paraquat. **B.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec un perlage dendritique suite à une exposition au paraquat. **C.** Images représentant le neurone ASH marqué par le rapporteur fluorescent *Psra-6::DsRed* (haut), le colorant fluorescent vert DiO (milieu) ou la superposition des deux (bas) chez **iii)** les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* et **iv)** les vers de type sauvage après exposition au paraquat. **D.** Tableau récapitulatif des résultats de la superposition du marqueur fluorescent *Psra-6::DsRed* et du colorant DiO, suite à l'exposition au paraquat (proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; ns : non significatif). Échelle = 10 μ m. $N \geq 58$ pour chacun des génotypes dans toutes les conditions.

3.2 Résultats obtenus sur le modèle de la maladie de Huntington

3.2.1 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les défauts moteurs chez un modèle de maladie de Huntington

Les répétitions étendues anormales du codon CAG (>35) au niveau de la queue polyglutamique (polyQ35+) de la protéine Huntingtine ont précédemment été établies comme étant

toxiques chez plusieurs espèces, notamment, chez *C. elegans* (Morley *et al.*, 2002 ; Hoffner et Dijan, 2014 ; Rudich *et al.*, 2020). Parmi les phénotypes engendrés par la queue polyglutamique mutée, des défauts de la fonction motrice ont été décrits. Afin de savoir si la restriction calorique a un effet sur ces défauts moteurs, nous avons utilisé un modèle de maladie de Huntington, *rmIs190(F25B3.3p::Q67::CFP)*, qui exprime la queue polyglutamique de la Huntingtine avec 67 répétitions CAG. Comme contrôle, nous avons utilisé *rmIs172(F25B3.3p::Q19::CFP)*, qui ne code que pour 19 répétitions CAG de la queue polyglutamique de la protéine Huntingtine. J'ai croisé ces souches de modèle de la maladie et le contrôle avec des mutants *eat-2(ad465)* afin d'évaluer les effets de la restriction calorique.

Pour toutes ces souches, j'ai effectué un test de motilité de nage (*thrashing assay*) sur des vers au jour 5 de l'âge adulte (Figure 3.4A). Ce test de nage consiste à mettre des vers dans un milieu liquide et de compter, par minute, le nombre de battements que fait un ver avec son corps. Le principe de ce test est de considérer qu'une diminution dans la fréquence des battements, comparativement aux souches contrôles, est un défaut de motilité. Pour les vers de types sauvage N2 et nos vers contrôles *rmIs172(polyQ19)*, aucune différence significative dans le nombre de battements du corps n'a été observée (Figure 3.4B). Les mutants *eat-2(ad465)* et souches *rmIs172(polyQ19); eat-2(ad465)* ont présenté un nombre de battements significativement plus élevé, comme attendu (Figure 3.4B). Le nombre de battements des mutants *rmIs190(polyQ67)* était le plus faible, ce qui indique une baisse de motilité chez le modèle de la maladie (Figure 3.4B). Enfin, chez les doubles mutants *rmIs190(polyQ67); eat-2(ad465)*, le nombre de battements était augmenté de manière significative par rapport aux vers du modèle *rmIs190(polyQ67)* de la maladie de Huntington (Figure 3.4B), indiquant que la restriction calorique a un effet d'amélioration de la condition motrice chez ce modèle. À noter que la motilité n'était pas rétablie au niveau des souches contrôles (type sauvage ou polyQ19), mais ces résultats restent encourageants. De plus, l'amélioration varie d'un animal à l'autre, et il serait intéressant de déterminer si ces effets sont stables pour un individu donné ou variables dans le temps pour tous les vers de cette souche *rmIs190(polyQ67); eat-2(ad465)*.

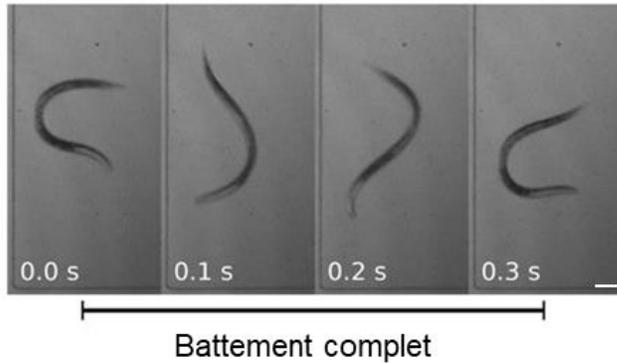
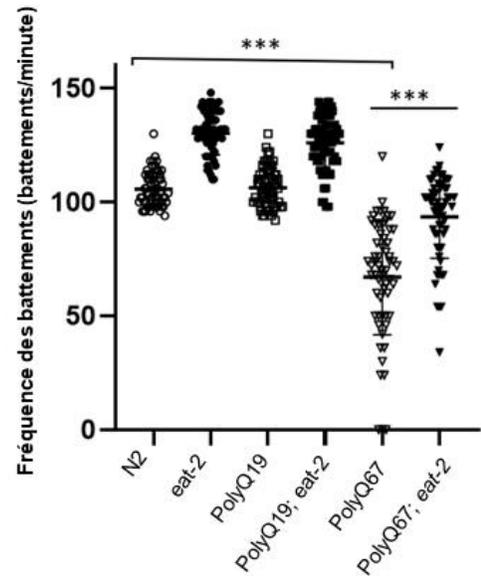
A**B**

Figure 3.4 Tests de motilité (*thrashing assay*) chez les vers de type sauvage (N2), les contrôles *rmIs172*(polyQ19), les mutants simples *eat-2*(*ad465*) et *rmIs190*(polyQ67), et les doubles mutants *rmIs190; eat-2*(*ad465*), au jour 5 de l'âge adulte. **A.** Images d'intervalles de temps montrant un battement complet chez un ver nageant dans une goutte de M9 (adapté de Shivers *et al.*, 2017). **B.** Graphique montrant les résultats des tests de motilité (*thrashing assay* ; proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). Échelle = 100 μ m. $N \geq 60$ pour chacun des génotypes.

3.2.2 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les agrégations protéiques chez le modèle de maladie de Huntington

3.2.2.1 Effet de la restriction calorique médiée par la mutation *eat-2*(*ad465*)

Comme mentionné précédemment, l'élongation anormale de la queue polyglutamique de la protéine huntingtine induit l'accumulation de cette protéine en agrégats (Bauer et Nukina, 2009). Nous avons donc raisonné que cette agrégation pourrait être responsable des défauts moteurs observés chez les vers modélisant la maladie de Huntington. Pour analyser l'accumulation en agrégats de la protéine huntingtine avec la queue polyglutamique (polyQ), nous avons utilisé les rapporteurs fluorescents *rmIs172*(polyQ19) et *rmIs190*(polyQ67), tous deux étant des fusions de la queue polyQ19 ou polyQ67, respectivement, avec la protéine fluorescente CFP (*cyan fluorescent protein*; les transgènes sont au fait *rmIs172*(polyQ19::FCP) et *rmIs190*(polyQ67::FCP). Ces rapporteurs ou fusions traductionnelles sont exprimées dans tous les neurones du ver (sous le contrôle du promoteur pan-neuronal *F25B3.3p*) (Figure 3.5A).

Ayant construit les souches avec *rmIs172*(polyQ19::FCP) ou *rmIs190*(polyQ67::FCP), avec ou sans la mutation *eat-2(ad465)*, j'ai pu quantifier l'agrégation de la polyQ au jour 3 de l'âge adulte (Figure 3.5B). Les souches contrôles qui expriment la polyQ19 sauvage, avec ou sans la mutation *eat-2(ad465)*, ne présentaient aucune accumulation de la queue polyQ19, comme attendu. Cependant, une différence significative a été notée entre les vers du modèle *rmIs190*(polyQ67) et les vers doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* (Figure 3.5B). En effet, les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* présentaient des agrégations moins étendues de la polyQ67 (représentées par des puncta de couleur cyan), au niveau de la tête (Figure 3.5B). Ceci suggère que la restriction calorique mène à une réduction de la taille des agrégats de la queue polyglutamique.

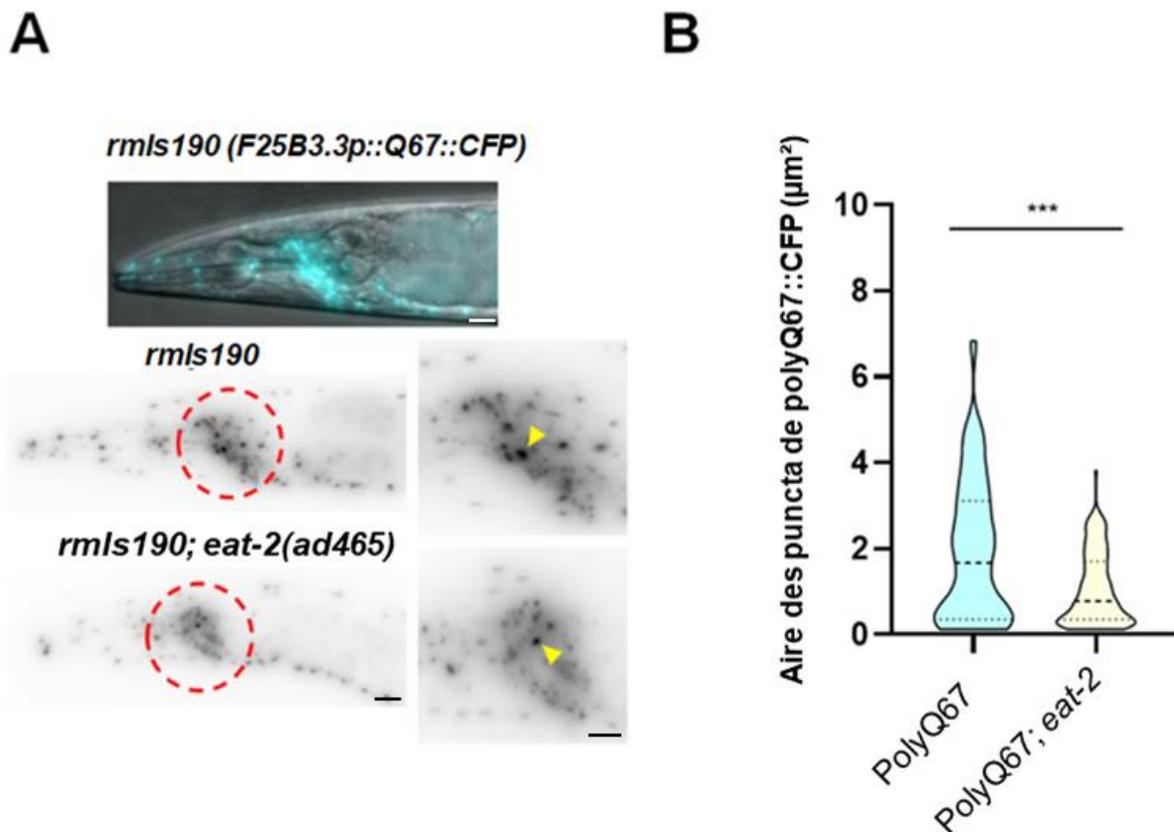


Figure 3.5 Résultats de la quantification de la taille des agrégats de la queue polyglutamique mutée (polyQ67) chez les animaux *rmIs190*(polyQ67) et *rmIs190; eat-2(ad465)*, au jour 3 de l'âge adulte. **A.** Visualisation de la taille des agrégats de la polyQ67 (triangles jaunes) avec le rapporteur *F25B3.3p::Q67::CFP* chez les mutants *rmIs190* (haut) et *rmIs190; eat-2(ad465)* (bas). L'agrégation de la polyQ67 au niveau de l'anneau nerveux (cercle en pointillés rouges) est agrandie à droite. **B.** Quantification de la taille des agrégats de polyQ67 entre les mutants *rmIs190* et *rmIs190; eat-2(ad465)* (proportion \pm erreur

standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Échelle = 10 μ m N \geq 60 pour chacun des géotypes.

3.2.2.2 Effet de la restriction calorique médiée par *drl-1*(ARNi)

Dans le but de solidifier ces derniers résultats, où la restriction calorique est associée à une réduction des agrégats protéiques de la polyQ67, nous avons testé un autre modèle de restriction calorique génétique, soit par le silençage du gène *drl-1* (pour *dietary restriction like*) par une approche d'ARN interférence (Chamoli *et al.*, 2014). En premier lieu, il fallut valider que la perte de fonction du gène *drl-1* a des effets neuroprotecteurs sur le système nerveux du ver, comparables à ceux de la restriction calorique médié par la mutation *eat-2(ad465)*. En effet, chez les vers de types sauvage, des altérations structurelles des neurones se manifestent avec l'âge, et ces changements neuroanatomiques sont robustement retardés par la restriction calorique chez les mutants *eat-2* (Khandekar, 2015). Nous avons donc réduit la fonction du gène *drl-1* par ARNi et analysé certains neurones de vers à différents âges. Cette analyse a été faite avec l'étudiant du laboratoire Yann Chabi (Figure 3.6A et B).

Pour cette approche, nous avons d'abord examiné certains neurones mécanosensoriels, en utilisant le rapporteur fluorescent *zDis4 (mec-4::GFP)*. Ce rapporteur a précédemment été utilisé par notre laboratoire (Khandekar, 2015) pour étudier l'effet de la restriction calorique médié par *eat-2(ad465)* sur le système nerveux. En effet, avec l'âge l'anneau nerveux se déplace postérieurement et les projections des neurones PLM s'allongent chez le type sauvage, ce qui est retardé par la mutation *eat-2(ad465)*. Nous avons donc soumis des vers P0 *zDis4 (mec-4::GFP)* de stade L4 sur des plaques contenant des bactéries *E. coli*(HT115) qui possèdent le plasmide qui permet le silençage du gène cible *drl-1* [ou le plasmide vide « EV » (*empty vector*) comme contrôle (Kamath et Ahringer, 2000)]. Puis nous avons régulièrement transféré sur de nouvelles plaques la progéniture F1 de ces vers afin de les observer au jour 3, 5 et 10 de l'âge adulte. Nous avons constaté que, similairement à la mutation *eat-2(ad465)*, l'inhibition de l'expression de *drl-1* retarde l'apparition des phénotypes liés à l'âge, comme la mutation *eat-2(ad465)* (Figure 3.6A et B). Cette vérification préliminaire démontre que l'ARNi de *drl-1* a des effets physiologiques détectables qui impactent le système nerveux. Il reste possible que ces effets soient en sous-estimation, surtout si la fonction de *drl-1* est cruciale pour les neurones, étant donné que : 1) l'ARNi a souvent des effets partiels et 2) la majorité

des neurones tendent à être réfractaire à l'ARNi chez *C. elegans*. Toutefois, suite aux effets détectés, nous avons décidé de poursuivre les expériences.

Suite à ces résultats, j'ai utilisé *drl-1*(ARNi) pour observer son effet sur l'agrégation de la queue polyglutamique (polyQ). J'ai donc soumis des vers mutants *rmIs190*(polyQ67) à *drl-1*(ARNi), afin d'évaluer l'agrégation polyglutamique de leur progéniture au jour 3 et 5 de l'âge adulte (Figure 3.6C). Nos résultats nous ont révélé que, comparativement aux vers mutants transférés sur les plaques contrôles « EV » le silençage du gène *drl-1* a réussi à diminuer la taille des agrégats de polyQ67 (Figure 3.6C). Ces résultats indiquent que la restriction calorique exercée par la mutation *eat-2(ad465)* ou par le silençage de *drl-1*, diminution de la taille des agrégats des protéines Hht polyglutamiques de ce modèle de maladie de Huntington, ce qui pourrait être bénéfique.

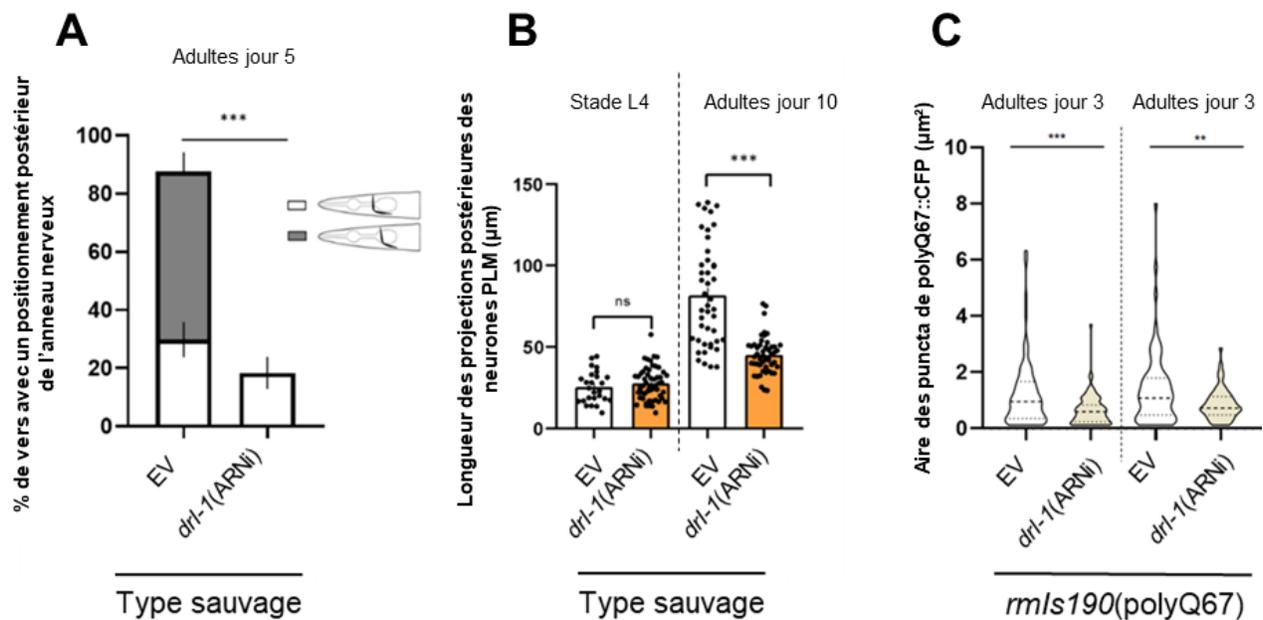


Figure 3.6 Résultats des expériences de silençage du gène *drl-1* par ARNi chez les vers de type sauvage et les animaux *rmIs190*(polyQ67). **A.** Graphique représentant le pourcentage de vers qui présentent un positionnement postérieur de l'anneau nerveux lorsque soumis à la restriction calorique [*drl-1*(ARNi)], au jour 5 de l'âge adulte. L'anneau nerveux a été visualisé avec le rapporteur fluorescent *Pmec-4::GFP*. **B.** Graphique représentant la longueur des projections postérieures des neurones PLM chez des animaux dont la mère et eux même ont été soumis à la restriction calorique [*drl-1*(ARNi)]. L'observation de PLM a été faite au stade L4 et au jour 10 de l'âge adulte. Les neurones PLM ont été visualisés avec le rapporteur fluorescent *Pmec-4::GFP*. Le travail sur PLM a été fait en collaboration avec Yann Aghiles Chabi. **C.** Quantification de la taille des agrégats de polyQ67 au jour 3 et 5 de l'âge adulte chez les animaux *rmIs190*, lorsque soumis à la restriction calorique [*drl-1*(ARNi)] (proportion ± erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont

indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0.01$). $N \geq 50$ pour chacun des génotypes dans toutes les conditions. EV : *empty vector*.

3.2.3 Étude de l'effet de la restriction calorique sur les agrégations intraneuronales de la queue polyglutamique chez un modèle de maladie de Huntington

Nous avons ensuite voulu savoir si ces agrégations de la protéine avec queue polyglutamique s'accumulent au niveau des neurones et si tel est le cas, si la restriction calorique favorise la diminution des agrégats dans ces neurones. Pour ce faire, j'ai examiné deux types de neurones. J'ai croisé les vers modélisant la maladie de Huntington, soumis ou non à la restriction calorique [*eat-2(ad465)*], avec des vers qui expriment les rapporteurs *qvIs19 (Psra-6::DsRed)* et *jsIs973 (Pmec-7::mRFP)*, qui marquent respectivement des neurones chimiosensoriels (Figure 3.7A) et des neurones mécanosensoriels (Figure 3.8A). J'ai ensuite observé ces vers au jours 3 et 5 de l'âge adulte. Pour les neurones ASH, je n'ai comptabilisé que la présence d'agrégation de polyQ à l'intérieur du neurone. Pour les neurones mécanosensoriels, j'ai comptabilisé comme « défaut » tout neurone présentant soit (1) la présence d'agrégation de polyQ à l'intérieur des neurones, (2) un allongement, (3) une faible fluorescence ou (4) de la neurodégénérescence (Figure 3.8B).

Quant à l'agrégation de la queue polyQ, mes résultats ont révélé que les agrégats de la version avec polyQ67 peuvent s'accumuler à l'intérieur de ASH et des neurones mécanosensoriels. De plus, les souches doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* avaient un pourcentage significativement inférieur de présence d'agrégations de polyQ67 à l'intérieur de ASH (Figure 3.7B) et des neurones mécanosensoriels (Figure 3.8C et D), comparativement à celui des simples mutants *rmIs190*. Cependant, il est important de noter qu'au jour 5 de l'âge adulte, il n'y a plus de différence significative du pourcentage de vers qui présentent des accumulations de polyQ67 à l'intérieur des neurones mécanosensoriels entre les souches de *rmIs190(polyQ67)* et du double *rmIs190; eat-2(ad465)* (Figure 3.8D). Ceci indique l'effet de diminution des agrégats par la restriction calorique semble s'affaiblir avec l'âge. Ces résultats seront discutés dans le chapitre « discussion ».

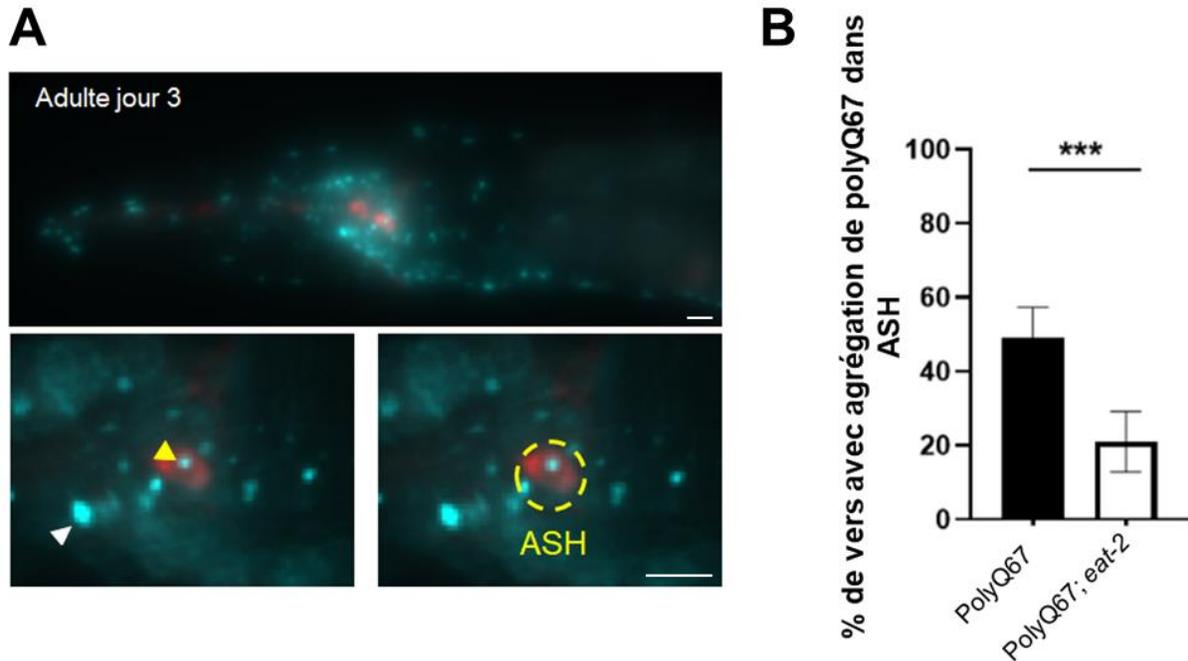


Figure 3.7 Résultats de la quantification du nombre de vers qui présentent des agrégats de la queue polyglutamique mutée (polyQ67) à l'intérieur du neurone ASH. **A.** Visualisation d'agrégats de la polyQ67 avec le rapporteur *F25B3.3p::Q67::CFP* à l'extérieur (triangle blanc) et à l'intérieur (triangle jaune) du neurone ASH (cercle en pointillés jaune) chez les mutants *rmIs190(polyQ67)*, au jour 3 de l'âge adulte. **B.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec des agrégats de polyQ67 à l'intérieur du neurone ASH entre les simples mutants *rmIs190(polyQ67)* et doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* (proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). Échelle = 10 μ m. $N \geq 60$ pour chacun des génotypes.

En ce qui concerne les défauts observés au niveau des neurones mécanosensoriels AVM, ALM, PVM et PLM, ceux-ci sont quasiment absents chez les souches contrôles *rmIs172(polyQ19)* et *rmIs172(polyQ19); eat-2(ad465)* (Figure 3.8C et D). En contraste, des défauts sont présents chez les mutants *rmIs190(polyQ67)* et *rmIs190(polyQ67); eat-2(ad465)* (Figure 3.8C et D). À noter que, comparativement aux mutants simples *rmIs190(polyQ67)*, les défauts sont amoindris chez les doubles mutants *rmIs190(polyQ67); eat-2(ad465)* au jour 3 et 5 de l'âge adulte pour chaque classe de neurone (AVM, ALM, PVM et PLM ; Figure 3.8C et D). L'ensemble de ces résultats montre que les neurones ont moins de défauts en condition de restriction calorique dans ce modèle de maladie de Huntington. Ceci suggère que la restriction calorique a un effet protecteur de chez ce modèle de maladie de Huntington.

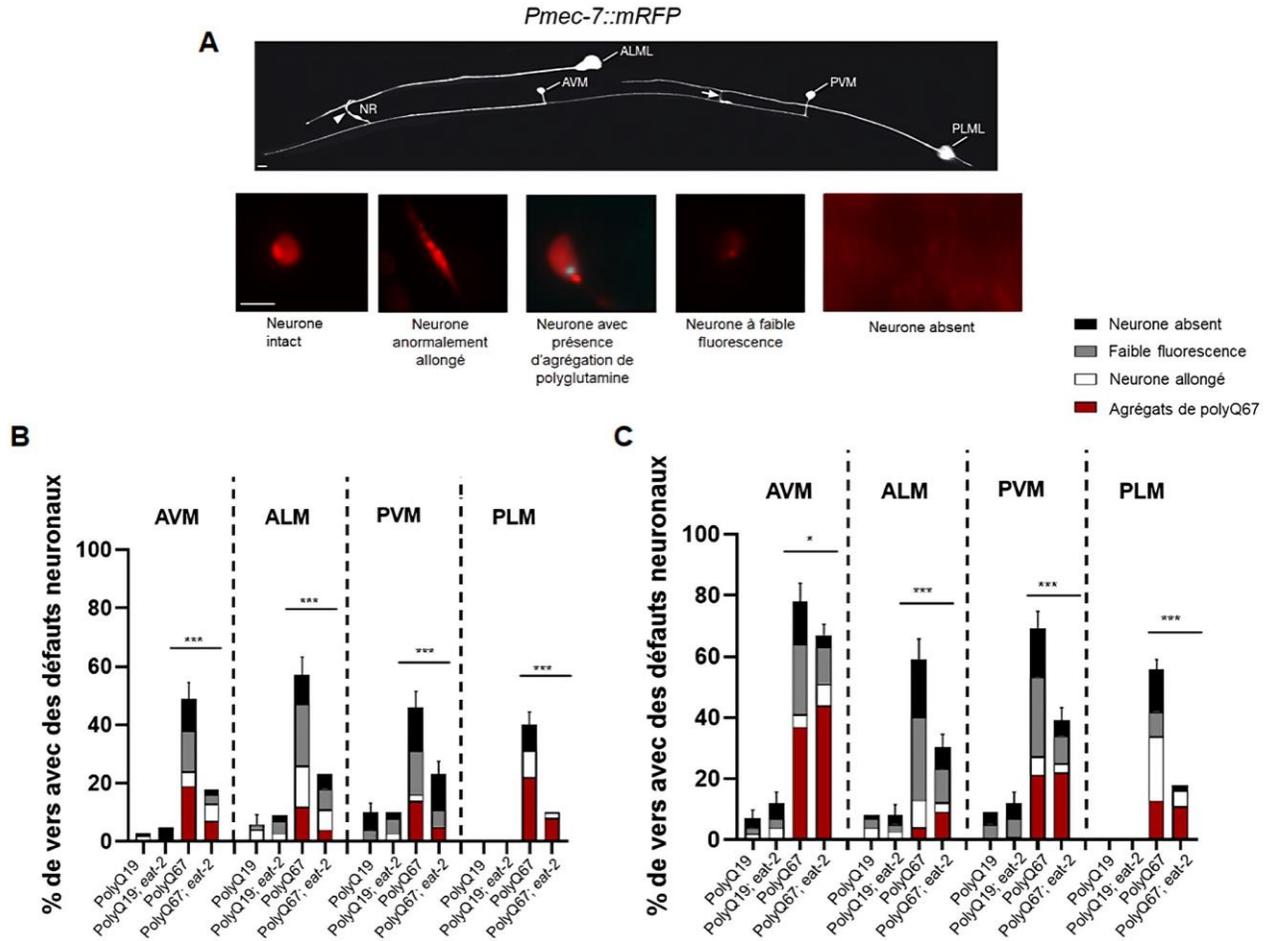


Figure 3.8 Résultats de la quantification du nombre de vers avec des défauts des neurones mécanosensoriels, au jour 3 et 5 de l'âge adulte chez les vers contrôles *rmIs172*(polyQ19), les mutants simples *eat-2(ad465)* et *rmIs190*(polyQ67), et les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)*. **A.** Visualisation des neurones mécanosensoriels AVM, ALM, PVM et PLM avec le rapporteur fluorescent *Pmec-7::mRFP*. Adapté de WormAtlas. **B.** Types de défauts des neurones mécanosensoriels observés avec le rapporteur *Pmec-7::mRFP*. **C.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec des défauts des neurones mécanosensoriels au jour 3. **D.** Graphique représentant le pourcentage de vers avec des défauts des neurones mécanosensoriels au jour 5 de l'âge adulte (proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$). Échelle = 10 μ m. $N \geq 60$ pour chacun des génotypes.

3.2.4 Exploration de l'autophagie dans l'effet de la restriction calorique

Plusieurs études ont montré que l'autophagie a un rôle dans la médiation des effets de la restriction calorique, chez plusieurs organismes (Hansen *et al.*, 2008 ; Chung et Chung, 2019). Afin de déterminer si tel est le cas chez le modèle de la maladie de Huntington utilisé dans ce travail, j'ai effectué des expériences d'ARNi ciblant divers gènes d'autophagie bien caractérisés chez *C. elegans*. J'ai d'abord fait une expérience pilote, où les gènes de la phase initiale (*lgg-1*, *atg-7*, *atg-*

13) ou tardive (*cup-5*) de l'autophagie ont été silencés par ARNi chez les mutants *rmIs190*(polyQ67), au jour 3 de l'âge adulte de la progéniture (Figure 3.9A). Ces résultats initiaux ont révélé que, lorsque l'expression du gène *lgg-1* est inhibée, les animaux du modèle de la maladie de Huntington *rmIs190*(polyQ67) présentent de plus grosses agrégations de la queue polyQ67, en comparaison aux autres gènes testés (Figure 3.9A). Donc, le gène *lgg-1*, impliqué dans la phase initiale de l'autophagie (Yang *et al.*, 2022), a été choisi pour la suite.

Pour déterminer si l'effet de la restriction calorique par *eat-2(ad465)* sur la taille des agrégats de la polyQ67 dépend de l'activité d'autophagie, j'ai réduit la fonction du gène *lgg-1* chez les mutants *eat-2(ad465)* portant le modèle de la maladie. J'ai donc traité diverses souches par *lgg-1*(ARNi), ou par ARNi contrôle (vecteur vide), et j'ai examiné par microscopie les animaux au jour 3 de l'âge adulte. J'ai comparé la taille des agrégats de polyQ67 chez les souches contrôles *rmIs172*(polyQ19) et *rmIs172; eat-2(ad465)* et les souches modélisant la maladie de Huntington *rmIs190*(polyQ67) et *rmIs190; eat-2(ad465)* (Figure 3.9B). Ces résultats ont montré, dans un premier temps, que la réduction de la fonction de *lgg-1* n'engendre pas d'accumulation de polyQ19 dans contrôle (Figure 3.9B). En second lieu, le silençage du gène *lgg-1* a induit une augmentation de la taille des agrégats de la polyQ67 chez les mutants *rmIs190* et souches *rmIs190; eat-2(ad465)*, comparativement aux vers traités avec l'ARNi contrôle (vecteur vide ; Figure 3.9B). Ceci suggère que lorsque l'autophagie est perturbée, l'effet de la restriction calorique par la mutation *eat-2(ad465)* est diminué, et que donc l'autophagie est requise pour l'effet protecteur de la restriction calorique.

Néanmoins, lorsque *lgg-1* est silencé, une différence de la taille des puncta de polyQ67 entre les mutants simples *rmIs190*(polyQ67) et les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* subsiste. Même si cette différence est beaucoup moins accentuée [$p < 0.001$ (EV) à $p < 0.05$ (ARNi(*lgg-1*))] (Figure 3.9B), celle-ci suggère que des facteurs, autres que l'autophagie, interviennent dans la médiation des effets bénéfiques de la restriction calorique. En résumé, ces résultats indiquent que l'autophagie contribue aux effets bénéfiques de la restriction calorique, dans le cas de ce modèle de la maladie de Huntington.

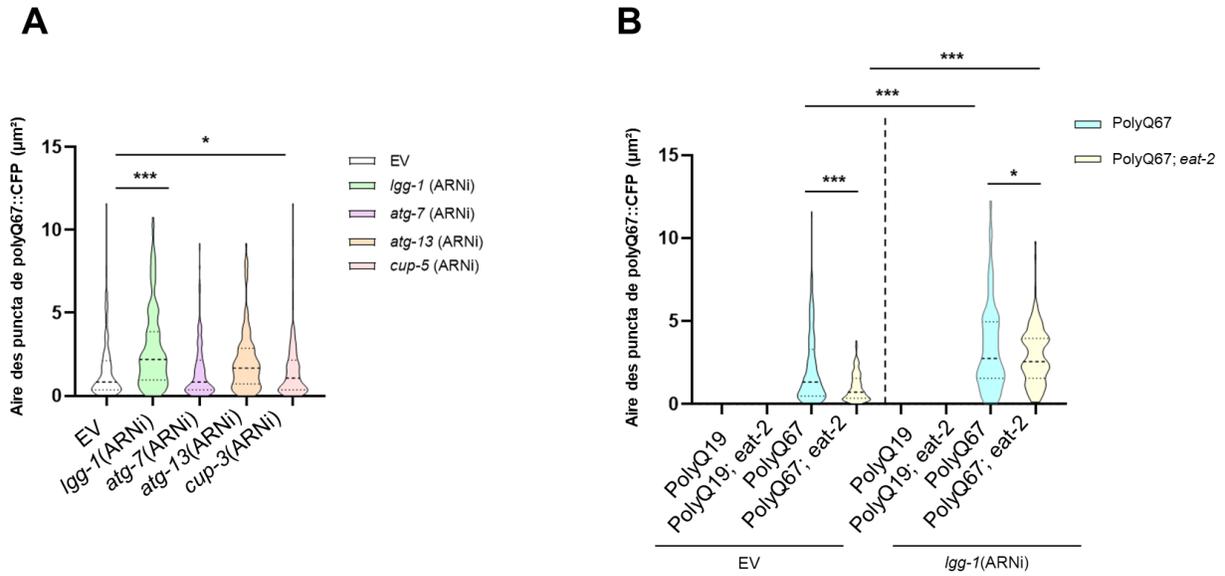


Figure 3.9 Résultats de la quantification de la taille de la queue polyglutamiée mutée (polyQ67) après disruption de l'autophagie par ARNi, au jour 3 de l'âge adulte. **A.** Graphique représentant la taille des agrégats de polyQ67 après silençage des gènes de la phase initiale (*lgg-1*, *atg-7*, *atg-13*) et tardive (*cup-5*) de l'autophagie, chez les mutants simples *rmIs190*. **B.** Graphique représentant la taille des agrégats de polyQ67 lorsque *lgg-1* est silençé, chez les vers contrôles *rmIs172*(polyQ19), les mutants simples *eat-2*(*ad465*) et *rmIs190*(polyQ67) et les doubles mutants *rmIs190; eat-2*(*ad465*) (proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$). Sauf pour les expériences pilotes (A), $N \geq 50$ pour tous les génotypes dans toutes les conditions. EV : *empty vector*.

CHAPITRE 4

Discussion des résultats et perspectives

En raison de l'impact crucial de la restriction calorique, diverses recherches ont été menées dans le passé sur *C. elegans*. Par exemple, Steinkraus *et al.*, (2008) ont démontré que la restriction calorique permettait non seulement de diminuer la protéotoxicité liée aux maladies neurodégénératives chez *C. elegans* mais aussi d'augmenter l'espérance de vie, de manière dépendante de HSF-1. Étonnement, d'autres études ont démontré que, contrairement aux recherches citées précédemment, la restriction calorique n'a aucun effet sur la protéotoxicité neuronale, liées aux maladies neurodégénératives (Tauffenberger *et al.*, 2012). De plus, Tauffenberger *et al.*, (2012) ont également démontré que l'enrichissement du milieu en glucose a réussi à diminuer cette protéotoxicité neuronale. Ces conclusions opposées mettent en lumière la nécessité d'une compréhension plus approfondie des mécanismes sous-jacents à la relation entre la restriction calorique et la neurodégénérescence. C'est dans cette optique que s'inscrit mon projet de recherche : déterminer l'effet de la restriction calorique sur la progression des maladies neurodégénératives et examiner les mécanismes impliqués dans cette potentielle interaction.

Dans ce but, des modèles de *C. elegans* de sclérose latérale amyotrophique et de la maladie de Huntington ont été soumis à la restriction calorique. Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles génétiques de restriction calorique : la mutation *eat-2(ad465)* et l'inhibition de l'expression du gène *drl-1* ("dietary restriction like"). Il en est ressorti que l'impact de la restriction calorique est fortement déterminé par le contexte pathologique dans lequel elle est appliquée. En effet, les résultats ont révélé que dépendamment de la maladie neurodégénérative, la restriction calorique peut accentuer ou atténuer les défauts observés chez les modèles de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington, respectivement. L'interprétation des résultats ci-dessus serait renforcée d'avantage par une confirmation moléculaire du niveau d'expression du transgène dans les différentes conditions étudiées. Néanmoins, ces résultats contrastés soulèvent des questions cruciales quant aux mécanismes sous-jacents à ces réponses divergentes. Les mécanismes pouvant expliquer ces différences seront discutés ultérieurement. Cette étude visait donc à éclairer les mécanismes moléculaires et cellulaires complexes qui sous-tendent l'interaction

entre la restriction calorique et les processus de neurodégénérescence, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives dans la compréhension et la gestion des maladies neurodégénératives.

4.1 La restriction calorique exacerbe les défauts du modèle de sclérose latérale amyotrophique

Dans un premier temps, nos expériences ont démontré que la restriction calorique [*eat-2(ad465)*] conduit à une aggravation des défauts observés chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique *sod-1(rt451); eat-2(ad465)* chez *C. elegans*, après induction d'un stress oxydatif (Figures 3.1-3.3). Bien que ces résultats n'allassent pas dans le sens de notre hypothèse, ceux-ci n'étaient pas tant surprenants en vue des recherches parallèles sur la pertinence des régimes hypercaloriques et riches en graisses sur les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique. En effet, une étude récente du EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) a montré que des niveaux élevés de graisse corporelle avant le diagnostic sont associés à un risque réduit de décès par sclérose latérale amyotrophique (Gallo *et al.*, 2013). De plus, des taux élevés de triglycérides et un rapport cholestérol (HDL et LDL) accru, semblent augmenter la survie des patients (Dupuis *et al.*, 2004). Par ailleurs, il est communément établi que l'état de santé des personnes atteintes de sclérose latérale amyotrophique chute brusquement à partir du moment où les patients commencent à présenter des difficultés à se nourrir (Tanenbaum et Taft, 2013), corrélant avec une diminution de l'apport calorique.

Ces études chez l'humain sont également cohérentes avec des recherches faites sur des modèles murins, montrant que chez les souris mutantes SOD1, un régime riche en calories a permis d'améliorer la survie des animaux de 20% (Joardar *et al.*, 2017). Bien que d'autres études soient nécessaires, il semble que les régimes riches en calories soient bien tolérés et aient un potentiel thérapeutique dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique, contrairement à notre hypothèse. Ces informations pourraient donc rationaliser nos résultats inattendus. À l'avenir, il serait intéressant de voir si des formulations nutritives spécifiques sont bénéfiques pour des populations de patients ciblés en fonction de la cause sous-jacente de la maladie et des profils métaboliques individuels.

4.2 Le perlage dendritique pourrait représenter une étape précoce de la neurodégénérescence chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique

Nos résultats ont révélé que, lorsqu'appliquée sur les vers modélisant la sclérose latérale amyotrophique, la restriction calorique a exacerbé les défauts des mutants *sod-1(rt451)*. Ceci s'est traduit par un pourcentage de survie plus faible (Figure 3.1B) et une augmentation significative des défauts d'absorption de colorants (Figure 3.2B) ainsi qu'un perlage dendritique au niveau du neurone ASH (Figure 3.3 A et B). Cependant, même après exposition à une concentration relativement forte de paraquat (2.5 mM), aucune absence du neurone ASH, qui suggérerait une neurodégénérescence, n'a été observée avec le rapporteur fluorescent *qvIs19*. Pourtant, la sclérose latérale amyotrophique est une maladie caractérisée par la perte de neurones glutamatergiques chez plusieurs espèces, allant des modèles murins à l'humain. Une raison qui pourrait expliquer l'absence de neurodégénérescence chez les mutants *sod-1(rt451)*, en comparaison aux autres modèles étudiés pourrait être liée à la simplicité de *C. elegans*. En effet, même si *C. elegans* présente plusieurs avantages dû à sa simplicité, cela signifie également que sa biologie et ses processus pathologiques pourraient ne pas refléter pleinement ceux d'organismes plus complexes tels que la souris ou l'humain. Par exemple, certaines voies de signalisations, pertinentes pour la sclérose latérale amyotrophique, pourraient ne pas exister de la même manière chez *C. elegans*. Ceci pourrait empêcher le vers de capturer pleinement la subtilité de la pathologie et entraîner des différences dans la progression de la sclérose latérale amyotrophique (Nussbaum-Krammer et Morimoto, 2014). De plus, il est également possible que le fait d'avoir observé les mutants *sod-1(rt451)* au jour 1 de l'âge adulte n'ait pas fourni le temps nécessaire à la neurodégénérescence d'avoir lieu ou alors que la durée de vie de *C. elegans* ne soit pas assez étendue pour observer quelconque dégénérescence du neurone ASH dans ce contexte.

Une autre raison qui pourrait expliquer l'absence de neurodégénérescence chez les mutants *sod-1(rt451)*, serait de comprendre la contribution des variants de SOD1 au développement de la neurodégénérescence et leurs interactions avec divers facteurs environnementaux. En effet, il est maintenant établi qu'il y a des variants plus agressifs que d'autres (Berdyński *et al.*, 2022). Par exemple, G85R (le variant utilisé pour notre modèle *C. elegans* de sclérose latérale amyotrophique) est significativement associé à une progression de la maladie beaucoup moins sévère, K3E présente une progression moyenne et G41S induit la progression la plus agressive (Berdyński *et al.*, 2022).

Ces différences peuvent être attribuées à des changements structurels et fonctionnels de la SOD1 mutée (ex : perte de fonction ou gain de fonction toxique). Il serait donc pertinent, à l'avenir, d'étudier d'autres variants de SOD1, dits « plus agressifs », afin de déterminer l'effet de ces derniers sur le système nerveux de *C. elegans*.

Néanmoins, même si aucune perte du neurone ASH n'a été notée, un perlage dendritique a été observé (Figure 3.3A et B). En effet, nos résultats ont révélé que tous les vers qui présentaient des défauts d'absorption de colorants, exhibaient un perlage dendritique et vice versa (Figure 3.3C et D). Il est donc injustifié d'interpréter l'absence de coloration du neurone ASH par les colorants DiI et DiO comme une neurodégénérescence. En effet, il est plus probable que l'absence de coloration du neurone ASH par les colorants DiI et DiO soit causée par des défauts morphologiques ou fonctionnels. Ainsi, les colorants lipophiles sont pertinents pour nous informer rapidement sur l'état global des neurones, mais des analyses plus profondes sont nécessaires afin de déterminer spécifiquement l'altération neuronale sous-jacente.

Pour revenir au perlage dendritique, ce dernier a été défini il y a plus de quatre décennies comme une des premières caractéristiques du dommage neuronal (Olney *et al.*, 1979). Cette forme de défaut neuronal est considérée comme l'un des premiers changements structurels préliminaires à la neurodégénérescence. Des études ultérieures à celle-ci ont souligné une association omniprésente de la dysfonction mitochondriale et du perlage dendritique dans un vaste éventail de maladies neurodégénératives (Johri et Beal, 2012). Ceci se manifeste par une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, des changements morphologiques et une baisse des niveaux d'ATP (Johri et Beal, 2012). Ces observations sont particulièrement convaincantes dans un contexte de sclérose latérale amyotrophique causée par une mutation de SOD1, en prenant en considération son rôle crucial au niveau des mitochondries. Cependant, plusieurs autres études contredisent cette hypothèse. Différentes recherches attestent que malgré une corrélation importante entre le dysfonctionnement mitochondrial et le perlage dendritique, la dépolarisation mitochondriale et la baisse consécutive de l'ATP intracellulaire ne sont pas suffisantes pour induire constitutivement un perlage dendritique (Greenwood *et al.*, 2007 ; Verma *et al.*, 2018). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les causes et mécanismes du perlage dendritique dans le contexte de la sclérose latérale amyotrophique, afin de décrypter comment agit SOD1 mutée pour induire ces défauts neuronaux.

Néanmoins, ce qui est à noter est que ce phénomène de perlage dendritique pourrait représenter une forme précoce de neurodégénérescence. Cette notion fournirait une hypothèse supplémentaire quant à l'absence de neurodégénérescence des mutants *sod-1(rt451)*. En vérité, nous ne pouvons ni confirmer ou infirmer la perte de neurones glutamatergiques des modèles sclérose latérale amyotrophique chez *C. elegans*, dû à un seuil de sensibilité des vers au paraquat. En effet, même lorsqu'exposés à des concentrations faibles de paraquat (0.5 mM), les vers finissent par mourir après une trop longue exposition (plus de 48 heures). À l'avenir, il serait donc intéressant de trouver une nouvelle méthode d'induction du stress oxydatif, sans causer de mort précoce, afin de déterminer si une potentielle neurodégénérescence des neurones glutamatergiques est observable chez *C. elegans*. Par exemple, exposer les animaux pendant 48 heures à des concentrations plus faibles de paraquat, afin d'observer ces animaux à des âges plus avancés, soit au jour 10, 15 ou 20 de l'âge adulte.

4.3 La restriction calorique atténue les défauts du modèle de la maladie de Huntington chez *C. elegans* via la diminution des agrégats de polyglutamine

Contrairement aux résultats obtenus avec le modèle de sclérose latérale amyotrophique, la restriction calorique a permis de diminuer les défauts observés chez les vers modélisant la maladie de Huntington. Dans un premier temps, nos expériences ont révélé que la restriction calorique permet d'atténuer les défauts moteurs chez les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* (Figure 3.4). Une raison qui pourrait expliquer l'amélioration de la fonction motrice du modèle de maladie de Huntington lorsque soumis à la restriction calorique est la réduction de la taille des agrégats de la queue polyglutamique mutée (polyQ67) (Figure 3.5). Cette réflexion vient du fait qu'une multitude d'études ont démontré les propriétés toxiques de la polyQ mutée sur les neurones de *C. elegans*. En effet, plusieurs recherches ont révélé que la polyQ mutée entraînerait des déficits moteurs, des anomalies comportementales et une neurodégénérescence chez *C. elegans* (McC Campbell *et al.*, 2001 ; Bates, 2003 ; Duennwald *et al.*, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2010). Une explication de la toxicité médiée par la polyQ mutée résulte d'observations que les agrégats de polyQ peuvent séquestrer des protéines cellulaires fonctionnels, contenant des domaines polyQ plus courts. Par exemple, McC Campbell *et al.* (2000) ont montré que le recrutement de la protéine CBP (*CREB binding protein*), un cofacteur de transcription qui contient un domaine polyglutamique, dans les agrégats de polyQ, était associé à une toxicité neuronale. La CBP représente un candidat particulièrement

intéressant car elle est présente à des niveaux fonctionnellement limitants dans la cellule. De ce fait, différentes voies de signalisation cellulaire concourent pour l'utilisation de la CBP. En raison de ses niveaux limitants dans la cellule, la séquestration de CBP par les agrégats de polyQ67 représente une cause évidente de la toxicité de la polyQ mutée. De plus, le protéome prédit de *C. elegans* contient approximativement 200 protéines avec des motifs polyQ, y compris les protéines nécessaires à la protéostasie et à la réponse au stress cellulaire [par exemple, ATX-3 (*Ataxin 3*), SGTA (*Small Glutamine-rich, Tetratricopeptide repeat-containing protein Alpha*), SIN-3 (*yeast Switch INdependent histone deacetylase component homolog 3*) et PQE-1 (*PolyQ toxicity Enhancer 1*)] (Michelitsch et Weissman, 2000). Il ne serait donc pas déraisonnable de suggérer que certaines de ces protéines sont séquestrées au fil du temps par les agrégats de polyQ et ont un rôle dans la toxicité médiée par l'agrégation de la polyQ, chez *C. elegans*. Par conséquent, il serait pertinent que les recherches futures se focalisent sur l'identification des protéines cibles séquestrées par les agrégats de polyQ. Par exemple, des essais de co-immunoprécipitation (co-IP), de purification en tandem d'affinité (*Tandem affinity purification*), de marquage dépendant de la proximité (*Proximity-dependent labeling*) ou des analyses de précipitation (*Pull-down assays*), seraient pertinents pour identifier les protéines séquestrées ou qui interagissent avec les agrégats de polyglutamine. De plus, un séquençage ARN pourrait également permettre d'identifier les gènes dont l'expression serait directement ou indirectement influencée par la huntingtine. Par exemple, nous savons que la huntingtine mutée, séquestre certains facteurs de transcriptions, tels que la protéine CBP (McC Campbell *et al.*, 2000). Ce type d'interaction pourrait donc indirectement modifier les niveaux d'expressions de certains gènes. Ainsi, déterminer comment la polyQ influence le déroulement des processus cellulaires est essentiel pour comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de la maladie de Huntington. Par ailleurs, il est aussi possible que ces agrégats ne soient pas toxiques en soi et qu'ils soient simplement une conséquence neutre d'un dysfonctionnement cellulaire sous-jacent à la neurodégénérescence. Enfin, il est également essentiel de considérer la possibilité que les conditions (restriction calorique ou non) et traitements différents (ARNi) peuvent influencer l'expression des transgènes *F25B3.3p::Q19::CFP* et *F25B3.3p::Q67::CFP* et par conséquent, modifier les phénotypes observés. La vérification de l'expression de la queue polyglutamique polyQ67 renforcerait nos résultats.

4.4 La restriction calorique retarde l'accumulation des agrégats de polyglutamine dans les neurones de *C. elegans*

Étant donné que nos résultats ont révélé que la taille des agrégats de polyQ a efficacement été diminuée par la restriction calorique (Figure 3.5), nous avons voulu déterminer dans quels neurones cet effet pouvait s'observer. Ainsi, nous avons étudié le neurone chimiosensoriel ASH (Figure 3.7) et les neurones mécanosensoriels AVM, ALM, PVM et PLM (Figure 3.8), basé sur les indications de la littérature. Nos résultats ont révélé que la polyQ67 s'agrégeait effectivement au niveau des neurones observés et que, contrairement au neurone ASH, les neurones mécanosensoriels présentaient des défauts supplémentaires. Surtout, nos résultats ont révélé que la restriction calorique [*eat-2(ad465)*] a permis de diminuer ces défauts. Néanmoins, ces défauts ainsi que leur diminution suite à la restriction calorique, n'expliquent ni l'altération des fonctions motrices des mutants *rmIs190*(polyQ67), ni son amélioration chez les mutants *rmIs190; eat-2(ad465)*. En effet, dans ce contexte, l'altération de la fonction motrice est plus susceptible d'être liée aux neurones moteurs. Il faudrait donc explorer l'effet de la polyQ67 sur ces neurones dans le futur. Nous ne pouvons que spéculer que la restriction calorique pourrait potentiellement exercer un effet positif sur les neurones moteurs, compte tenu de nos résultats et du fait que notre modèle de maladie de Huntington exprime la polyQ67 dans tous les neurones (mais pas dans d'autres types cellulaires). L'implication des cellules musculaires dans le cas de notre étude est ainsi écartée. Il serait donc pertinent d'étudier cette hypothèse à l'avenir.

Un autre élément important à noter est qu'au jour 5 de l'âge adulte, les vers modélisant la maladie de Huntington, soumis ou non à la restriction calorique, semblaient ne plus présenter de différence significative quant à l'agrégation de polyQ67 à l'intérieur des neurones mécanosensoriels (Figure 3.8D). Cette perte de différence pourrait être interprétée à tort comme une diminution de l'efficacité de la restriction calorique sur les agrégats de polyQ67 au fur que les vers vieillissent. Bien que cela puisse être vrai dans une certaine mesure, ici, la perte de différence serait surtout liée à un déséquilibre dans le nombre de neurones mécanosensoriels entre ces deux souches. En d'autres termes, le pourcentage d'accumulation de la polyQ67 dans les neurones mécanosensoriels ne peut pas être quantifié et comparé de manière équitable. En effet, nous savons que les mutants *rmIs190*(polyQ67) présentent un plus grand taux de défauts neuronaux et de neurodégénérescence des neurones mécanosensoriels. Par conséquent, cela réduit le nombre de neurones où la polyQ67

peut s'accumuler. Par exemple, si entre 5 vers *rmIs190*, 3 d'entre eux ont perdu le neurone AVM, il ne reste que 2 vers avec des neurones AVM, où la polyQ67 peut s'agréger. Alors que pour les vers *rmIs190; eat-2(ad465)*, les vers perdront moins de neurones AVM, où la polyQ67 pourrait s'accumuler. De ce fait, il en résulterait plus d'accumulation de polyQ67, chez les mutants de maladie de Huntington, soumis à la restriction calorique. Ainsi, ce déséquilibre dans le nombre de neurones entre les vers *rmIs190* et *rmIs190; eat-2(ad465)*, pourrait expliquer la perte de différence entre le pourcentage de vers présentant des agrégats de polyQ67 dans les neurones mécanosensoriels. Dans ce contexte, il serait préférable, à l'avenir, de normaliser ces résultats en fonction du nombre de neurones, plutôt que du pourcentage de vers.

Toutefois, au jour 5 de l'âge adulte, nous avons noté une augmentation d'autres défauts neuronaux (neurones allongés, faible fluorescence, neurone absent) chez les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)*, comparativement au jour 3 de l'âge adulte. Ce pourcentage reste significativement inférieur à celui des simples mutants *rmIs190*(polyQ67). Ces résultats nous suggèrent que la restriction calorique retarde les défauts du modèle de maladie de Huntington, plutôt que de supprimer leur apparition. Des interrogations pertinentes subsistent : est-ce qu'une différence entre les vers mutants *rmIs190* et *rmIs190; eat-2(ad465)* serait encore notable au jour 10 de l'âge adulte ? En d'autres termes, combien de temps l'effet de la restriction calorique demeure observable ? De même pour le neurone ASH pour lequel aucune dégénérescence n'a été observée. Serait-ce toujours le cas au jour 10 de l'âge adulte ? Dans le cas contraire, est-ce que la restriction calorique permettrait de retarder ou empêcher une potentielle neurodégénérescence ? Des études supplémentaires sur la dynamique de l'agrégation de la polyQ, ainsi que l'effet à long terme de la restriction calorique sur les modèles de maladies neurodégénératives seraient donc essentielles.

4.5 L'autophagie est impliquée dans la médiation de l'effet bénéfique de la restriction calorique sur le modèle de maladie de Huntington chez *C. elegans*

L'implication de l'autophagie dans le vieillissement a longtemps été étudiée. En effet, une autophagie réduite, en lien avec l'âge, a largement été rapportée dans un vaste éventail d'organismes (Leidal *et al.*, 2018). Par exemple, la diminution du niveau de transcription des gènes liées à l'autophagie a été détectée chez les nématodes et la drosophile (Sarkis *et al.*, 1988 ; Simonsen *et al.*, 2008) ainsi que des tissus âgés des mammifères et d'humains (Cuervo et Dice, 2000 ; Kaushik *et al.*, 2012 ; Carnio *et al.*, 2014). Fait intéressant, des preuves croissantes montrent

que l'autophagie pourrait jouer un rôle bénéfique dans les troubles neuroaux tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Lee, 2012 ; Kesidou *et al.*, 2013). Par exemple, dans le cas des protéinopathies, les protéines mutées et susceptibles de s'agréger dans les neurones, ne peuvent pas être réparties par la division cellulaire, étant donné que les neurones sont des cellules post-mitotiques. Par conséquent, les neurones requièrent des systèmes bien régulés de contrôle de la qualité des protéines, y compris l'autophagie.

Dans le cas de la maladie de Huntington, la pathogenèse est fortement influencée par une dysfonction de l'autophagie neuronale (Ravikumar *et al.*, 2004). Cependant, les événements moléculaires conduisant à cette dysfonction demeurent incertains. De nombreuses approches thérapeutiques, visant à traiter la maladie de Huntington sont en développement, via la manipulation de l'autophagie. Plusieurs rapports suggèrent que l'activation de l'autophagie induit la dégradation à la fois des formes agrégées et solubles de la protéine HTT (huntingtine) et atténue les anomalies comportementales, motrices ainsi que le développement de la maladie dans les systèmes modélisant la maladie de Huntington (Cortes et La Spada, 2014 ; Ravikumar *et al.*, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2004 ; Rose *et al.*, 2010). Par exemple, la rapamycine a réussi à réduire la toxicité de la polyQ mutée et a diminué les phénotypes comportementaux et défauts moteurs chez des modèles murins de maladie de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2004). De plus, le tréhalose, la rilménidine, ainsi que la phénoxazine, des activateurs de l'autophagie indépendants de mTOR, ont également amélioré l'élimination de la polyQ mutée et ont diminué les défauts observés chez ces mêmes modèles murins de maladie de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2004). Par ailleurs, de récentes études sur *C. elegans* ont également souligné l'importance de l'autophagie dans la maladie de Huntington. Yang *et al.* (2022), ont réussi à mettre en évidence le rôle de l'autophagie sur les agrégats de polyQ mutée, chez des modèles *C. elegans* de maladie de Huntington, en inhibant l'expression de gènes liés à l'autophagie. En effet, lorsque les gènes des phases initiale et tardive de l'autophagie ont été silencés chez les vers, une accumulation de polyQ mutée accrue a été observée. Dans l'ensemble, les recherches ont révélé plusieurs liens entre l'autophagie et les protéinopathies à neurodégénérescence telles que la maladie de Huntington, d'où la décision de focaliser la suite de mon projet sur cet axe.

Parallèlement, il a été démontré que dans des conditions de stress, notamment en cas de restriction calorique, l'autophagie est activée de manière substantielle afin de favoriser la survie cellulaire (Kaeberlein *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2007 ; Kapahi *et al.*, 2010 Feng *et al.*, 2014). En effet, l'autophagie joue un rôle clé dans la médiation des effets de la restriction calorique sur la longévité et ce, chez plusieurs organismes tels que *C. elegans*, la levure, la drosophile et les modèles murins. Par exemple, chez *C. elegans*, il a été démontré que les effets de la mutation *eat-2(ad465)* et l'inhibition de l'expression du gène *drl-1*, deux modèles génétiques de restriction calorique, sont inhibés lorsque l'expression de PHA-4 est silencée. Le facteur de transcription PHA-4 est également nécessaire à l'induction de l'autophagie en conditions de restriction calorique (Hansen *et al.*, 2008 ; Chamoli *et al.*, 2014). Ces observations indiquent que l'augmentation de la fonction autophagique, notamment via la restriction calorique, peut être une approche efficace pour retarder le vieillissement et promouvoir l'apparition des maladies neurodégénératives chez différentes espèces, y compris chez les mammifères.

Dans l'ensemble, les informations ci-dessus nous ont poussé à approfondir notre analyse du rôle de l'autophagie dans l'effet bénéfique de la restriction calorique que nous avons observé sur le modèle de maladie de Huntington. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la restriction calorique [*eat-2(ad465)*] maintiendrait son effet sur la taille des agrégats de polyQ67, même lorsque l'autophagie est interrompue [*lgg-1*(ARNi)] (Figure 3.9B). Nos résultats ont révélé que (1) la taille des agrégats de polyQ67 chez les mutants *rmIs190*(polyQ67) a augmenté, suite à l'interruption de l'autophagie et (2) l'effet bénéfique de la restriction calorique chez le modèle de maladie de Huntington a été atténué (Figure 3.8A). Ces résultats suggèrent que l'autophagie joue un rôle important dans la clairance de la polyQ agrégée mais surtout que l'activité autophagique intervient également dans les effets bénéfiques de la restriction calorique.

Par ailleurs, une différence significative de la taille des agrégats de polyQ67 entre les simples mutants *rmIs190* et les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* était toujours présente. Il est donc probable que des facteurs, autres que l'autophagie, interviennent dans la médiation des effets de la restriction calorique. Cette hypothèse est davantage développée dans la section 4.6.

4.6 L'autophagie n'est pas le seul mécanisme responsable de la médiation de l'effet de la restriction calorique

De par nos résultats précédents (Figure 3.9B), il est devenu apparent que l'autophagie n'est pas le seul facteur ayant un rôle dans la médiation des effets de la restriction calorique. Comme mentionné précédemment, la restriction calorique emprunte plusieurs voies moléculaires afin de médier ses effets. Par exemple, nous savons que dans le cas de la mutation *eat-2(ad465)*, une régulation à la hausse du facteur de transcription DAF-16 a été notée (Hansen *et al.*, 2008). En plus d'induire la transcription des gènes nécessaires à l'autophagie (ex : *lgg-1*), DAF-16 entraîne également la transcription d'autres protéines telles que les protéines HSF-1 (*heat shock factors*), HIF-1 et SKN-1 (Lin *et al.*, 2018). Ces protéines renforcent la résistance au stress cellulaire et au stress oxydatif, antérieurement identifié comme facteurs sous-jacents dans la maladie de Huntington (Kumar et Ratan, 2016 ; Singh *et al.*, 2019). De plus, d'autres études ont également identifié les dysfonctionnements mitochondriaux comme mécanisme potentiellement impliqué dans l'apparition de la maladie de Huntington (Carmo *et al.*, 2018 ; Jurcau et Jurcau, 2023). Par ailleurs, la restriction calorique joue un rôle bien connu dans la protection des mitochondries, impliquant divers gènes et voies moléculaires (Martin-Montalvo et De Cabo, 2013 ; López-Lluch et Navas, 2016). Par exemple, un homologue de SIRT1 des mammifères, SIR-2.1, est activé en réponse à la restriction calorique et contribue à maintenir l'intégrité mitochondriale en désacétylant des protéines mitochondriales spécifiques et en réduisant le stress oxydatif (Merksamer *et al.*, 2013). De plus, la modulation de la voie de la protéine kinase AMPK, pendant la restriction calorique, favorise la biogenèse mitochondriale et améliore l'élimination des mitochondries endommagées via mitophagie (Cantó et Auwerx, 2011). Enfin, des études récentes ont mis à jour des protéines ayant un rôle similaire aux PGC-1 α des mammifères, chez *C. elegans*, telles que ATGL-1. Cette protéine contribue à une biogenèse mitochondriale accrue sous des conditions de restriction calorique (Wang *et al.*, 2019). Ces mécanismes complexes protègent collectivement la fonction mitochondriale, fournissant ainsi, une explication alternative potentielle de l'effet bénéfique de la restriction calorique sur le modèle de la maladie de Huntington.

En outre, il est également nécessaire de souligner que des études récentes ont rapporté que les neurones adultes chez *C. elegans* expulsent des vésicules entourées d'une membrane (d'environ 4 μ m de diamètre), appelées exophères. Après avoir été découvertes chez *C. elegans*, les exophères

ont également été identifiées chez les mammifères, plus particulièrement, dans les cardiomyocytes murins et les neurones (Nicolás-Ávila *et al.*, 2020 ; Siddique *et al.*, 2021 ; Suku *et al.*, 2021). Ces vésicules extracellulaires contiennent des agrégats de protéines et des organites (Melentijevic *et al.*, 2017). Mais encore, il a été observé que les neurones générant des exophères semblaient mieux fonctionner que ceux n'en produisant pas, lorsqu'ils étaient soumis à un stress protéotoxique. De manière intéressante, il a été suggéré que l'inhibition de la dégradation des protéines par la perturbation de l'autophagie permet d'augmenter la production de ces exophères. Ainsi, la formation d'exophères peut faire partie d'une réponse alternative, visant à débarrasser les cellules de composants neurotoxiques lorsque la protéostasie est mise à l'épreuve (Melentijevic *et al.*, 2017). Un intérêt considérable a été suscité par l'observation que, chez *C. elegans*, les neurones expulsent les agrégats de protéines associés aux protéinopathies, via les exophères, pouvant contribuer à soulager la neurodégénérescence (Melentijevic *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2023). Des recherches complémentaires chez *C. elegans* ont révélé que la production d'exophères peut être considérablement augmenté par le jeûne, de manières dépendantes et indépendants de DAF16/FOXO (Cooper *et al.*, 2021). En effet, l'élévation induite des niveaux d'exophères, par le jeûne, ne nécessite pas les facteurs de transcription HSF-1, HIF-1, ou SKN-1, mais dépend en partie de DAF-16/FOXO (Cooper *et al.*, 2021). Cependant, ces données n'excluent pas la possibilité que HSF-1, HIF-1, ou SKN-1 puissent fonctionner de manière redondante dans la réponse des exophères au jeûne (Cooper *et al.*, 2021). Ainsi, la manière dont DAF-16 intervient dans l'induction des exophères reste à clarifier. Ceci apportera une compréhension à un réseau moléculaire hautement complexe, qui semble médier la multitude d'effets bénéfiques liés à la restriction calorique. Par exemple, nous avons démontré que la restriction calorique [*eat-2(ad465)*] ne perd pas entièrement son effet bénéfique chez les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* lorsque l'autophagie est interrompue. Il serait donc intéressant de déterminer s'il y a une augmentation de la production d'exophères chez les mutants *eat-2(ad465)*, en premier lieu, en utilisant des rapporteurs fluorescents qui marquerait les exophères (ex : *Pmec-4::mCherry*). Par la suite, nous pourrions également interrompre cette production d'exophères (ex : silençage des gènes des filaments intermédiaires par ARNi (Arnold *et al.*, 2023) en plus de l'autophagie, pour déterminer si l'effet bénéfique de la restriction calorique chez les doubles mutants *rmIs190; eat-2(ad465)* est totalement aboli. En effet, Wang *et al.* (2023) ont démontré que lorsque l'autophagie est interrompue via *atg-16.2*(ARNi) chez un modèle de maladie de Huntington, la production

d'exophères augmente. Il ne serait donc pas déraisonnable de penser que cela pourrait également être le cas dans des conditions de restriction calorique [*eat-2(ad465)*]. Ainsi, des études supplémentaires sur l'implication des exophères, comme de l'autophagie sont nécessaires et seraient grandement pertinentes pour les recherches sur les protéinopathies.

4.7 L'augmentation de l'activité autophagique pourrait expliquer l'effet opposé de la restriction calorique entre les modèles de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington chez *C. elegans*

Les résultats contrastés obtenus après avoir soumis les modèles de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Huntington à la restriction calorique nous ont poussé à nous demander si l'autophagie y joue un rôle. Une notion qui pourrait expliquer l'aggravation des défauts observés chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)* serait de considérer l'augmentation de l'activité autophagique médiée par la restriction calorique. Tout d'abord, des études précédentes ont mis en évidence des liens entre la physiopathologie de la sclérose latérale amyotrophique et l'accumulation d'autophagosomes dans le cytoplasme des neurones de la moelle épinière des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Sasaki, 2011). De plus, des modèles de souris mutantes SOD1 ont révélé une augmentation de formation d'autophagosomes, ainsi qu'une diminution de l'activité de mTOR (Saxena *et al.*, 2013), une hausse des niveaux de la protéine de cargaison de l'autophagie p62 (*ubiquitin-binding protein p62* ; Gal *et al.*, 2007 ; An *et al.*, 2014) et du facteur de transcription TFEB (régulateur de l'expression des gènes de biogenèse autophagique et lysosomale) et de Beclin1 (Settembre et Ballabio, 2011). Collectivement, ces paramètres indiquent l'activation de la machinerie autophagique. Cependant, cette activité ne se reflète pas dans la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles (An *et al.*, 2014). Ceci suggère une défaillance progressive de l'activité lysosomale au cours de la progression de la sclérose latérale amyotrophique (Xie *et al.*, 2015).

De manière intéressante, la rapamycine, dont le rôle bénéfique sur les modèles de maladie de Huntington avait précédemment été établi (Ravikumar *et al.*, 2004), joue un rôle opposé chez les modèles animaux de sclérose latérale amyotrophique. En effet, le traitement par la rapamycine dans les modèles murins SOD1G93A aggrave la dégénérescence des motoneurones et conduit à davantage de décès chez les souris atteintes de sclérose latérale amyotrophique (Zhang *et al.*, 2011). D'autre part, le rôle de l'autophagie semble être déterminé par le stade de la dégénérescence des

neurones moteurs. Alors qu'au début du processus de neurodégénérescence, l'autophagie est essentielle pour maintenir les jonctions neuromusculaires chez les souris *SOD1*mut, aux stades tardifs, l'autophagie s'est avérée néfaste. L'élimination d'*Atg7* dans ce cas a réduit la progression de la maladie et augmenté la durée de vie des souris (Rudnick *et al.*, 2017). Enfin, des études récentes avaient également démontré que *SOD1*, lorsque mutée, interagissait avec des facteurs nécessaires à l'activité autophagique et entravait cette dernière (Huai et Zhang, 2019).

A l'appui de ces informations, nous avons précédemment réalisé des expériences préliminaires afin d'observer la dynamique des autophagosomes, chez le modèle de sclérose latérale amyotrophique [*sod-1(rt451)*], lorsque soumis à la restriction calorique [*eat-2(ad465)*] ou non. Pour ce faire, nous avons utilisé le marqueur fluorescent *sqIs11 (lgg-1p::mCherry::GFP::lgg-1)*, dont le marquage fonctionne comme suit : les autophagosomes sont marqués en jaune (présence simultanée de protéines fluorescentes vertes et rouges à l'intérieur des autophagosomes) et les autolysosomes, en rouge (le pH acide à l'intérieur des autolysosomes, étouffe la fluorescence de la GFP). Ainsi, l'accumulation d'autophagosomes (en jaune) implique une interruption de l'autophagie. Mes résultats préliminaires montrent une augmentation dans l'accumulation d'autophagosomes chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*, comparativement aux mutants simples *sod-1(rt451)* ou *eat-2(ad465)*, suggérant un dysfonctionnement accru de l'activité autophagique chez les doubles mutants *sod-1(rt451) eat-2(ad465)*. Il serait intéressant, à l'avenir, d'étendre l'étude des mécanismes d'autophagie et leur implication dans la réponse de la restriction calorique dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique.

4.8 Vulnérabilité neuronale spécifique aux maladies neurodégénératives

Une observation récurrente au fil de nos résultats était que certains types de neurones exhibaient une vulnérabilité accrue aux modélisations de maladies neurodégénératives. Nous nous sommes alors demandé ce qui pourrait expliquer cette susceptibilité neuronale différentielle. En effet, les maladies neurodégénératives se caractérisent par leur impact spécifique sur des groupes particuliers de neurones, présentant des traits pathologiques et moléculaires distincts. Une caractéristique bien établie de ces pathologies est l'accumulation de protéines toxiques, qui joue un rôle central dans leur développement. Cette accumulation protéique, propre à chaque maladie, définit en grande partie sa progression. Par conséquent, on considère désormais les maladies

neurodégénératives comme des 'protéinopathies neuronales', où l'agrégation de protéines mal repliées est un facteur causal majeur. Outre ces protéines mal repliées, les maladies neurodégénératives partagent des schémas communs de dysfonctionnement de la protéostasie, de perturbation des voies de signalisation, ainsi que des altérations au niveau des organites cellulaires. Ces troubles incluent, entre autres, des dérèglements métaboliques qui sont également liés au processus de vieillissement. En conséquence, la vulnérabilité neuronale sélective pourrait résulter de la combinaison spécifique de ces dysfonctionnements intracellulaires et processus pathologiques. Ici, nous discutons comment des facteurs intrinsèques et extrinsèques influencent le développement des maladies neurodégénératives, notamment, sur les neurones particulièrement sensibles.

4.8.1 Le modèle de « seuil de stress » pour expliquer la vulnérabilité neuronale sélective

Un modèle largement considéré par les recherches sur la vulnérabilité neuronale spécifique est celui de « seuil de stress ». Ce modèle suggère que certains neurones sont plus vulnérables aux maladies neurodégénératives, en raison de facteurs tels que le stress cellulaire, des niveaux élevés d'excitation et de charges intracellulaires en Ca^{2+} , le vieillissement, le contexte génétique, les conditions médicales préexistantes et les facteurs environnementaux tels que des lésions physiques, des infections précédentes ou les conséquences chroniques du stress et des toxines environnementales (Vermeer *et al.*, 2003; Blasko *et al.*, 2004; Szczygielski *et al.*, 2005). Par exemple, les traumatismes crâniens répétés chez les joueurs de football sont fortement corrélés à une tauopathie ultérieure avec démence (McKee *et al.*, 2009). Ces neurones considérés « vulnérables », lorsqu'associés à des processus spécifiques liés aux maladies neurodégénératives, subissent finalement une dégénérescence. Parmi les facteurs qui peuvent s'accumuler et exacerber la vulnérabilité neuronale spécifique, nous pouvons citer :

Interaction des protéines mal repliées : Une hypothèse envisagée qui pourrait expliquer la vulnérabilité neuronale spécifique aux maladies neurodégénératives, est que l'accumulation des protéines mutées et mal repliées interfère avec des complexes de protéines régulatrices (Gidalevitz *et al.*, 2006 ; Haass et Selkoe, 2007 ; Winklhofer *et al.*, 2008 ; Williams et Paulson, 2008 ; Roth et Balch, 2011). Par exemple, de telles interactions peuvent saturer les sites de liaison de protéines d'échafaudage, importantes pour la transduction de signaux intracellulaires, ou peuvent séquestrer

des protéines nécessaires au maintien de l'équilibre cellulaire, telles que des protéines impliquées dans la protéostasie. Il est déjà établi que pour chaque protéine sujette au repliement incorrect, certains types de neurones sont plus affectés par la manière dont cette protéine perturbe les réseaux protéiques, et cela pourrait contribuer davantage à leur vulnérabilité sélective à une maladie neurodégénérative particulière (Fu, Hardy et Duff, 2018). En effet, des études chez *C. elegans* ont fourni des preuves que l' α -synucléine, liée à la maladie de Parkinson, forme préférentiellement des agrégats dans les neurones dopaminergiques du ver, où elle induit d'autres protéines au repliement incorrect, telles que les protéines qui contiennent des segments de polyQ (Brignull *et al.*, 2006 ; Lim *et al.*, 2008). De plus, les protéines mal repliées, associées à des formes familiales de maladies neurodégénératives, peuvent modéliser les mêmes maladies avec la même vulnérabilité neuronale spécifique, lorsqu'elles sont exprimées chez d'autres espèces, éloignées sur le plan évolutif, tels que le poisson-zèbre, la drosophile et *C. elegans* (Lessing et Bonini, 2009 ; Zhang *et al.*, 2010). Ces études sont cohérentes avec l'idée que ces protéines mutées interfèrent chacune avec des réseaux de signalisation cellulaire de manière spécifique, affectant ainsi préférentiellement des sous-types particuliers de neurones, dont les propriétés sont conservées sur le plan évolutif. Il est important de noter que l'accumulation de protéines mal repliées, seule, n'est souvent pas suffisante pour causer la maladie. Cela signifie que, même si des dépôts protéiques se forment dans les mêmes zones du cerveau ou les mêmes neurones chez certaines personnes âgées, tous ces individus ne développent pas nécessairement la maladie. Certains individus peuvent avoir ces dépôts sans montrer de symptômes significatifs de la maladie, tandis que d'autres peuvent la développer (Selkoe et Hardy, 2016). Cela suggère que d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, jouent un rôle crucial dans la progression de la maladie, en association avec l'accumulation de protéines mal repliées. Une observation, en somme, cohérente avec le modèle de seuil de stress mentionné plus haut. (Jellinger, 2004 ; Brignull *et al.*, 2006 ; Kern et Behl, 2009 ; Sperling *et al.*, 2009 ; Hedden *et al.*, 2009).

Profil d'expression génique : Lorsque l'on étudie les maladies neurodégénératives, il est important de comprendre quels gènes sont impliqués dans la maladie, en identifiant des variations génétiques spécifiques associées. Cependant, il est également nécessaire de comprendre comment ces variants fonctionnent et comment ils contribuent à la maladie. C'est là qu'intervient l'analyse de l'expression génique, spécifiques aux tissus et aux types cellulaires. C'est-à-dire qu'on se réfère au fait que

certaines gènes sont différentiellement exprimés d'un type neuronal à un autre. L'idée est de voir si les gènes associés à une maladie donnée, présentent des schémas d'expression similaires dans les types neuronaux où la maladie se manifeste mais aussi, d'avoir une idée sur le profil d'expression d'autres gènes, avec lesquels les protéines mutées, impliquées dans les maladies, peuvent interagir. Par exemple, les neurones moteurs vulnérables à la sclérose latérale amyotrophique se distinguent par leur expression élevée de la superoxyde dismutase SOD1 (Pramatarova *et al.*, 2001). Cependant, lorsque des mutations surviennent dans le gène SOD1, celle-ci se voit altérée dans sa capacité à neutraliser les radicaux libres. Cela crée un état de stress oxydatif, conduisant à des dommages cellulaires, notamment des dommages mitochondriaux (Guo *et al.*, 2013). Les neurones moteurs ont déjà des besoins énergétiques élevés, et les dommages mitochondriaux altèrent leur capacité à produire de l'énergie, contribuant ainsi à leur vulnérabilité dans la sclérose latérale amyotrophique (Vandoorne *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2022). En somme, ces études d'expression génique pourraient fournir des informations précieuses sur les mécanismes sous-jacents des maladies neurodégénératives et aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Homéostasie du calcium : Le manque de protéines de liaison au Ca^{2+} (telles que la parvalbumine ou la calbindine) et la perturbation de la régulation intracellulaire du Ca^{2+} sont, depuis longtemps, supposées jouer un rôle important dans la vulnérabilité des neurones aux maladies neurodégénératives (Iwamoto et Emson, 1991 ; Hof *et al.*, 1993 ; Morrison, Hof et Morrison, 1998 ; Morigaki et Goto, 2017). En effet, des études ont révélé que les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte, sélectivement affectée dans la maladie de Parkinson, partagent un ensemble de caractéristiques qui peuvent sous-tendre leur vulnérabilité (Chung *et al.*, 2005). Ils ont des axones longs et très ramifiés avec un nombre extraordinaire de sites de libération de neurotransmetteurs (Chung *et al.*, 2005 ; Greene, Dingledine et Greenamyre, 2005). Cette combinaison de caractéristiques semble conduire à une surcharge en Ca^{2+} intracellulaire et à un stress oxydatif mitochondrial (Sulzer, 2007 ; Surmeier, Obeso et Halliday, 2017). Ces observations ont également été notés au niveau des motoneurones de patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique (Chung *et al.*, 2005). Il est donc suggéré qu'un large flux de Ca^{2+} intracellulaire, combiné à de nombreux points de jonctions neuromusculaires entraînent des demandes énergétiques particulièrement élevées pour le fonctionnement de ces neurones (Chung *et al.*, 2005). En accord avec cette notion, la perte de l'homéostasie calcique et le dysfonctionnement

mitochondrial ont été impliqués dans de nombreux processus pathogènes des maladies neurodégénératives.

Les mitochondries et la demande énergétique : La distribution des mitochondries et les demandes énergétiques neuronales ont été suggérées comme facteurs potentiels dans la modulation de la vulnérabilité neuronales face aux maladies neurodégénératives (Schapira *et al.*, 1992 ; Hardy, 2016). Par exemple, les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte présentent des arbres axonaux beaucoup plus grands et un plus grand nombre de synapses que les neurones dopaminergiques d'autres régions du cerveau, ce qui peut entraîner une élévation considérable de leur demande énergétique (Brettschneider *et al.*, 2015). De telles demandes énergétiques élevées entraîneraient, à leur tour, des niveaux continuellement élevés de stress oxydatif et de dysfonctionnement mitochondrial qui pourraient augmenter la vulnérabilité des neurones à l'agrégation de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson (Brettschneider *et al.*, 2015). De plus, des études complémentaires ont révélé que les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte, affectées lors de la maladie de Parkinson, ont une masse mitochondriale plus faibles, comparativement aux autres neurones dopaminergiques, tels que ceux présents dans l'aire tegmentale ventrale, ce qui pourrait contribuer à la vulnérabilité sélective de la substance noire compacte par rapport à l'aire tegmentale ventrale (Bender *et al.*, 2006 ; Kraytsberg *et al.*, 2006).

Neurotransmetteurs et récepteurs de neurotransmetteurs : L'expression différentielle des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs entre les sous-types neuronaux a depuis longtemps été proposée pour expliquer la vulnérabilité sélective des neurones dans les maladies neurodégénératives (Choi, 1987 ; Greenamyre et Young, 1989 ; Morrison, 1993). Des études antérieures montrent que les neurones exprimant les sous-unités GluN1 et GluN2B des récepteurs NMDA sont plus sensibles aux effets du vieillissement et à la progression de la pathologie d'Alzheimer, suggérant qu'il pourrait y avoir des profils d'expression différentiels des sous-unités des récepteurs NMDA entre les neurones vulnérables et résistants (Mishizen-Eberz *et al.*, 2004 ; Magnusson *et al.*, 2010). De même, l'excitotoxicité induite par le glutamate par l'activation des récepteurs NMDA et AMPA dans le striatum est considérée comme l'une des causes de la vulnérabilité sélective des neurones MSN (*medium spiny neurons*) des modèles murins, dans la maladie de Huntington (Zeron *et al.*, 2002 ; Xia *et al.*, 2010). De plus, des recherches ont révélé des changements dans l'expression des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) et leur

relation avec la vulnérabilité neuronale (Lee *et al.*, 2004). En effet, une variation d'expression des mGluRs en fonction du type neuronal a été observée dans des régions cérébrales spécifiques, affectées par la sclérose latérale amyotrophique et pourrait jouer un rôle clé dans la neurodégénérescence sélective observée dans sclérose latérale amyotrophique et d'autres maladies neurodégénératives (Tomiyama *et al.*, 2001). Une caractérisation plus poussée du profil d'expression des récepteurs de neurotransmetteurs et de leurs sous-unités aidera à mieux comprendre la vulnérabilité sélective des neurones dans les maladies neurodégénératives.

En résumé, les maladies neurodégénératives représentent un ensemble complexe de troubles caractérisés par une vulnérabilité neuronale sélective. Cette vulnérabilité découle d'une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques, tous jouant un rôle crucial dans le développement de ces pathologies dévastatrices. Le modèle de « seuil de stress » émerge comme une perspective prometteuse pour expliquer cette vulnérabilité. Il suggère que certains neurones sont plus sensibles à la dégénérescence en raison de divers facteurs, tels que le stress cellulaire, les niveaux élevés d'excitation, le vieillissement, le contexte génétique, les conditions médicales préexistantes et les facteurs environnementaux. Lorsque ces facteurs s'accumulent et interagissent, ils peuvent conduire à un seuil critique de stress, déclenchant ainsi la progression des maladies neurodégénératives. En fin de compte, la compréhension des mécanismes qui induisent une vulnérabilité neuronale sélective dans les maladies neurodégénératives est un domaine de recherche en constante évolution. Les avancées dans la caractérisation de ces mécanismes apporteront des informations précieuses pour le développement de traitements ciblés visant à ralentir ou à prévenir ces affections débilitantes. La recherche continue dans ce domaine est essentielle pour améliorer la qualité de vie des patients et pour ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

CHAPITRE 5

Conclusion

Les résultats obtenus au fil de mon projet ont permis d'avoir une meilleure compréhension de l'effet de la restriction calorique face aux différents environnements pathologiques. Ainsi, les effets opposés de la restriction calorique, sur les modèles de sclérose latérale amyotrophique et de la maladie de Huntington, soulignent qu'il n'est pas si évident de classer la restriction calorique comme simplement « bénéfique » ou « néfaste » face aux maladies neurodégénératives mais que celle-ci dépendrait plutôt du contexte pathologique dans lequel elle est appliquée. Ces informations obtenues permettraient éventuellement d'ouvrir la voie vers des questionnements plus profonds, quant aux raisons inhérentes de l'effet différentiel de la restriction calorique. Quels mécanismes moléculaires sous-jacents, de la restriction calorique, participent à la médiation d'un effet bénéfique ou au contraire négatif ? Existe-t-il des biomarqueurs spécifiques qui pourraient être utilisés pour prédire la réponse à la restriction calorique, dans le contexte des maladies neurodégénératives ? Comment la durée et le moment de la mise en œuvre de la restriction calorique influencent-ils ses effets sur la progression de la maladie ? Les questions susmentionnées pourraient constituer le fondement de recherches futures visant à approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'impact de la restriction calorique dans le contexte des maladies neurodégénératives. De plus, répondre à ces questions pourraient potentiellement aider à la conception d'approches diététiques thérapeutiques et non invasives qui contribueraient au minimum, à retarder l'établissement des maladies neurodégénératives et au mieux, à identifier des voies moléculaires ou des gènes cibles, qui contribuerait au développement de traitements potentiels.

Enfin, il existe différentes manières d'induire la restriction calorique, qui n'empruntent pas toutes les mêmes voies moléculaires. Il serait donc intéressant de voir, à l'avenir, si ces différentes méthodes de restriction calorique entraînent des résultats différents, notamment, lorsque l'on considère que notre modèle génétique de restriction calorique (*eat-2(ad465)*), efficace en théorie, serait impossible à mettre en œuvre en pratique. En effet, il serait impensable d'appliquer et de maintenir une restriction calorique tout au long d'une vie, sans citer tous les effets secondaires qui y découleraient. De plus, des études récentes ont démontré que l'âge de l'initiation et la durée de la

restriction calorique sont des facteurs critiques qui influencent son efficacité. Plus précisément, lorsqu'appliquée à partir du milieu de vie, la restriction calorique a l'effet neuroprotecteur le plus puissant (Todorovic *et al.*, 2018). Les études actuelles sur les effets neuroprotecteurs de la restriction calorique présentent diverses limitations, notamment la complexité des interactions moléculaires en jeu, la variabilité individuelle dans la réponse à la restriction calorique (influencée par des facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux), la nécessité de faire des études à long termes pour déterminer l'effet de la restriction calorique sur la longévité, etc. Malgré ces obstacles, l'étude moléculaire de la restriction calorique demeure essentielle pour mieux comprendre ses mécanismes d'action et son potentiel en tant que stratégie pour améliorer la santé à long terme, encourageant ainsi la poursuite de la recherche dans ce domaine.

En conclusion à notre questionnement de base, concernant l'effet de la restriction calorique sur la neurodégénérescence, il convient de noter ceci : il ne peut être catégoriquement qualifié de bénéfique ou de néfaste, car son impact varie considérablement en fonction de la nature spécifique de la maladie et du contexte qui l'entoure. Nos résultats ont clairement démontré que la restriction calorique peut avoir des effets divergents sur la progression de différentes maladies neurodégénératives, avec des résultats favorables dans certains cas et des résultats moins concluants dans d'autres. De plus, il est devenu évident que le succès de la restriction calorique en tant que stratégie thérapeutique dépend étroitement de facteurs individuels, tels que le stade de la maladie, la génétique du patient et d'autres influences environnementales. Par conséquent, il est impératif d'adopter une approche personnalisée dans la prise en charge des patients atteints de maladies neurodégénératives, en tenant compte de l'ensemble du tableau clinique et biologique. Ces résultats soulignent la nécessité de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces variations d'effets. En fin de compte, cette complexité renforce l'idée que la gestion des maladies neurodégénératives doit être holistique et adaptée à chaque cas particulier pour optimiser les résultats cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

Alizadeh S., Anani-sarab G., Amiri H., Hashemia M. (2022). Paraquat induced oxidative stress, DNA damage, and cytotoxicity in lymphocytes. *Heliyon*, 8(7): e09895. <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2022.e09895>

An T., Shi P., Duan W., Zhang S., Yuan P., Li Z., Wu D., Xu Z., Li C., Guo Y. (2014). Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Molecular Neurobiology*, 49(3):1435-48. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8623-3>

Arnold M. L., Cooper J., Androwski R., Ardeshtna S., Melentijevic I., Smart J., Guasp R. J., Nguyen K. C. Q., Bai G., Hall D. H. *et al.* (2023). Intermediate Filaments Associate with Aggresome-like Structures in Proteostressed *C. elegans* Neurons and Influence the Rate of Large Vesicle Extrusions as Exophers. *bioRxiv*, 2022.08.03.501714. <https://doi.org/10.1101/2022.08.03.501714>

Avery L (1993). The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133(4):897-917. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.4.897>

Baskoylu S. N., Chapkis N., Unsal B., Lins J., Schuch K., Simon J., Hart, A. C. (2019). Disrupted Autophagy and Neuronal Dysfunction in *C. elegans* Knock-in Models of FUS Amyotrophic Lateral Sclerosis. *BioRxiv*, 7, 799932. <https://doi.org/10.1101/799932>

Baskoylu S. N., Yersak J., O'Hern P., Grosser S., Simon J., Kim S., Hart A. C. (2018). Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in *C. elegans* suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. *Public Library of Science Genetics*, 14(10), e1007682. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007682>

Bates G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *The Lancet*. 361(9369):1642-4. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13304-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13304-1)

Bauer P. O., Nukina N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *Journal of Neurochemistry*, 110(6), 1737–1765. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06302.x>

Bender A., Krishnan K. J., Morris C. M., Taylor G. A., Reeve A. K., Perry R. H., Jaros E., Hersheson J. S., Betts J., Klopstock T. *et al.* (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics*, 38(5):515-7. <https://doi.org/10.1038/ng1769>

Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H. R., Guarente L. (2006). *C. elegans* sir-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate daf-16 and extend life span. *Cell*, 125(6):1165-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.036>

Berdyński M., Miszta P., Safranow K., Andersen P. M., Morita M., Filipek S., Żekanowski C., Kuźma-Kozakiewicz M. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Scientific Reports*, 12: 103. <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-021-03891-8>

Betteridge D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49:3-8. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)

Bishop N. A., Guarente L. (2007). Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*, 447(7144):545-9. <https://doi.org/10.1038/nature05904>

Blasko I., Stampfer-Kountchev M., Robatscher P., Veerhuis R., Eikelenboom P., Grubeck-Loebenstein B. (2004). How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*, 3(4):169-76. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00101.x>

Brandi V. et Polticelli F. (2021). In Silico Analysis of Huntingtin Homologs in Lower Eukaryotes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6):3214. <https://doi.org/10.3390/ijms22063214>

Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1):71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>

Brettschneider J., Del Tredici K., Lee V. M-Y., Trojanowski J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(2):109-20. <https://doi.org/10.1038/nrn3887>

Brignull H. R., Moore F. E., Tang S. J., Morimoto R. I. (2006). Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a pan-neuronal *Caenorhabditis elegans* model. *Journal of Neuroscience*, 26(29):7597-606. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0990-06.2006>

Burtner C. R., Murakami C. J., Kennedy B. K., Kaeberlein M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 8(8): 1256–1270. <https://doi.org/10.4161%2Fcc.8.8.8287>

Cantó C., Auwerx J. (2011). Calorie restriction: is AMPK as a key sensor and effector? *Physiology*, 26(4): 214–224. <https://doi.org/10.1152%2Fphysiol.00010.2011>

Carmo C., Naia L., Lopes C., Rego A. C. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1049:59-83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_3

Carnio S., LoVerso F., Baraibar M. A., Longa E., Khan M. M., Maffei M., Reischl M., Canepari M., Loeffler S., Kern H. *et al.* (2014). Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell reports*, 8(5):1509-21. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.061>

Carrano A. C., Liu Z., Dillin A., Hunter T. (2009). A conserved ubiquitination pathway determines longevity in response to diet restriction. *Nature*, 460(7253):396-9. <https://doi.org/10.1038/nature08130>

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. 101(30):11159-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101>

Chalfie M, Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. et Prasher D. C (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 263(5148):802-5. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>

Chamoli M., Singh A., Malik Y., Mukhopadhyay A. (2014). A novel kinase regulates dietary restriction-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 13(4):641-55. <https://doi.org/10.1111/acel.12218>

Chapman T., Liddle L. F., Kalb J. M., Wolfner M. F., Partridge L. (1995). Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature*, 373(6511):241-4. <https://doi.org/10.1038/373241a0>

Chen D., Thomas E. L., Kapahi P. (2009). HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Public Library of Science Genetics*, 5(5):e1000486. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000486>

Chen J., Su Y., Lin F., Iqbal M., Mehmood K., Zhang H., Shi D. (2021). Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 224:112711. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112711>

Chen J. et Schedl T. (2021). A simple one-step PCR assay for SNP detection. *MicroPublication Biology*, 2021:10.17912. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000399>.

Choi D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 7(2):369-79. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-02-00369.1987>

Chung K. W., Chung H. Y. (2019). The Effects of Calorie Restriction on Autophagy: Role on Aging Intervention. *Nutrients*, 11(12): 2923. <https://doi.org/10.3390%2Fnu11122923>

Chung Y. H., Joo K. M., Nam R. H., Cho M. H., Kim D. J., Lee W. B., Cha C. I. (2005). Decreased expression of calretinin in the cerebral cortex and hippocampus of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Sciences*, 1035(1):105-9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.022>

Colman R. J., Beasley T. M., Kemnitz J. W., Johnson S. C., Weindruch R., Anderson R. M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature Communication*, 1:5:3557. <https://doi.org/10.1038/ncomms4557>

Cooper J. F., Guasp R. J., Arnold M. L., Grant B. D., Driscoll M. (2021). Stress increases in exopher-mediated neuronal extrusion require lipid biosynthesis, FGF, and EGF RAS/MAPK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(36):e2101410118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101410118>

Cortes C. J., La Spada A. R. (2014). The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug Discovery Today*, 19(7):963-71. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.014>

Cudkovicz M. E., McKenna-Yasek D., Sapp P. E., Chin W., Geller B., Hayden D. L., Brown R.H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 41(2), 210–221. <https://doi.org/10.1002/ana.410410212>

Cuervo M., Dice J. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40):31505-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.m002102200>

Cunha-Oliveira T., Montezinho L., Mendes C., Firuzi O., Saso L., Oliveira P. J., Silva F. S. G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020:5021694. <https://doi.org/10.1155/2020/5021694>

Dong M. Q., Venable J. D., Au N., Xu T., Park S. K., Cociorva D., Johnson J. R., Dillin A., Yates J. R. (2007). Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science*, 317(5838):660-3. <https://doi.org/10.1126/science.1139952>

Duennwald M. L., Jagadish S., Giorgini F., Muchowski P. J., Lindquist S. (2006). A network of protein interactions determines polyglutamine toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29):11051-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604548103>

Dupuis L., Oudart H., René F., Gonzalez de Aguilar J-L. et Loeffler J. P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30):11159-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101>

Elobeid A., Libard S., Leino M., Popova S. N., Alafuzoff I (2016). Altered proteins in the aging brain. *Journal of Neuropathology*, 75(4):316-25. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw002>

Evert A. B., Dennison M., Gardner C. D., Garvey W. T., Lau K. H. K., MacLeod J., Mitri J., Pereira R. F., Rawlings K., Robinson S. *et al.* (2019). Nutrition Therapy for Adults With Diabetes or Prediabetes: A Consensus Report. *Diabetes Care (Professional society guidelines)*, 42(5):731-754. <https://doi.org/10.2337/dci19-0014>

Faber P. W., Voisine C., King D. C., Bates E. A., Hart A. C. (2002). Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17131–17136. <https://doi.org/10.1073/pnas.262544899>

Fabrizio P., Pletcher S. D., Minois N., Vaupel J. W., Longo V. D. (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 557(1-3):136-42. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01462-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01462-5)

Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S. D., Gendron C. M., Longo V. D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292(5515):288-90. <https://doi.org/10.1126/science.1059497>

Feinberg E. H. et Hunter C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639):1545-7. <https://doi.org/10.1126/science.1087117>

Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24(1):24-41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>

Finkel T., Holbrook N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809):239-47. <https://doi.org/10.1038/35041687>

Fivenson E. M. (2017). Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochemistry*, 109:202-209. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.007>

Flanagan E. W., Most J., Mey J. T., Redman L. M. (2020). Calorie Restriction and Aging in Humans. *Annual Review of Nutrition*, 40:105-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-122319-034601>

Fontana L., Partridge L., Longo V. D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328(5976):321-6. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>

Friedman D. B., Johnson T. E. (1998). A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*, 118:75–86. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.1.75>

Fu H., Hardy J., Duff K. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10): 1350–1358. <https://doi.org/10.1038%2Fs41593-018-0221-2>

Gal J., Ström A-L., Kilty R., Zhang F., Zhu H. (2007). p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15):11068-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.m608787200>

Gallo V., Wark P. A., Jenab M., Pearce N., Brayne C., Vermeulen R., Andersen P. M., Hallmans G., Kyrozis A., Vanacore N. *et al.* (2013). Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 80(9): 829–838. <https://doi.org/10.1212%2FWNL.0b013e3182840689>

Gidalevitz T., Ben-Zvi A., Ho K. H., Brignull H. R., Morimoto R. I. (2006). Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science*, 311(5766), 1471–1474. <https://doi.org/10.1126/science.1124514>

Greenamyre J., Young B. (1989). Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 10(5):593-602. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(89\)90143-7](https://doi.org/10.1016/0197-4580(89)90143-7)

Greene J., Dingleline R., Greenamyre T. (2005). Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, 18(1):19-31. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.003>

Greenwood S. M., Mizielinska S. M., Frenguelli B. G., Harvey J., Connolly C. N. (2007). Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36):26235-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704488200>

Greer E. L., Banko M. R., Brunet A. (2009). AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1170:688-92. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04019.x>

Greer E. L., Brunet A. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*, 8(2):113-27. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00459.x>

Guarente L. (2005). Calorie restriction and SIR2 genes—towards a mechanism. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126:923–8. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.013>

Guo C., Sun L., Chen X., Zhang D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 8(21): 2003–2014. <https://doi.org/10.3969%2Fj.issn.1673-5374.2013.21.009>

Haass C., Selkoe D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>

Hansen M., Chandra A., Mitic L. L., Onken B., Driscoll M., Kenyon C. (2008). A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *Public Library of Science Genetics*, 4(2):e24. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040024>

Hansen M., Hsu A. L., Dillin A., Kenyon C. (2005). New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *Public Library of Science Genetics*, 1(1):119-28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010017>

Hansen M., Taubert S., Crawford D., Libina N., Lee S. J., Kenyon C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6(1):95-110. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00267.x>

Hardy J. (2016). Catastrophic cliffs: a partial suggestion for selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 44(2):659-61. <https://doi.org/10.1042/bst20150287>

Hartman P. S., Herman R. K. (1982). Radiation-Sensitive Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 102(2): 159–178. <https://doi.org/10.1093%2Fgenetics%2F102.2.159>

Hedden T., Van Dijk K. R. A., Becker J. A., Mehta A., Sperling R. A., Johnson K. A., Buckner R. L. (2009). Disruption of functional connectivity in clinically normal older adults harboring amyloid burden. *The Journal of Neuroscience*, 29(40):12686-94. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3189-09.2009>

Hedgecock E. M., Sulston J. E. et Thomson J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 220(4603):1277-9. <https://doi.org/10.1126/science.6857247>

Heestand B. N., Shen Y., Liu W., Magner D. B., Storm N., Meharg C., Habermann B., Antebi A. (2013). Dietary restriction induced longevity is mediated by nuclear receptor NHR-62 in *Caenorhabditis elegans*. *Public Library of Science Geneicst*, 9(7):e1003651. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003651>

Hemerková P., Vališ M. (2021). Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Antioxidant Metalloenzymes and Therapeutic Strategies. *Biomolecules*, 11(3): 437. <https://doi.org/10.3390%2Fbiom11030437>

Herndon L. A., Schmeissner P. J., Dudaronek J. M., Brown P. A., Listner K. M., Sakano Y., Paupard M. C., Hall D. H., Driscoll M. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, 419(6909):808-14. <https://doi.org/10.1038/nature01135>

Hof P. R., Nimchinsky E. A., Celio M. R., Bouras C., Morrison J. H. (1993). Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 152(1-2):145-8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90504-e](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90504-e)

Hoffner G., Djian P. (2015). Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? *Molecular Neurobiology*, 52(3):1297-1314. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8932-1>

Honjoh S., Yamamoto T., Uno M., Nishida E. (2009). Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*, 457(7230):726-30. <https://doi.org/10.1038/nature07583>

Huai J., Zhang Z. (2019). Structural Properties and Interaction Partners of Familial ALS-Associated SOD1 Mutants. *Frontiers in Neurology*, 10: 527. <https://doi.org/10.3389%2Ffneur.2019.00527>

Iwamoto N., Emson P. (1991). Demonstration of neurofibrillary tangles in parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brain. *Neuroscience Letters*, 128(1):81-4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90764-k](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90764-k)

Jellinger K. A. (2004). Head injury and dementia. *Current Opinion in Neurology*, 17(6):719-23. <https://doi.org/10.1097/00019052-200412000-00012>

Jensen M. D, Ryan D. H, Apovian C. M, Ard J. D, Comuzzie A. G, Donato K. A, Hu F. B, Hubbard V. S, Jakicic J. M, Kushner *et al.* (2014). 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*, ;129:S102-38. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee>

Jeppesen D. K., Bohr V. A., Stevnsner T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2):166-200. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.013>

Joardar A., Manzo E., Zarnescu D. (2017). Metabolic Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Challenges and Opportunities. *Current Genetic Medicine Reports*, 5(2): 108–114. <https://doi.org/10.1007%2Fs40142-017-0123-8>

Johri A., Beal M. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(3): 619–630. <https://doi.org/10.1124%2Fjpet.112.192138>

Jurcau A., Jurcau C. (2023). Mitochondria in Huntington’s disease: implications in pathogenesis and mitochondrial-targeted therapeutic strategies. *Neural Regeneration Research*, 18(7): 1472–1477. <https://doi.org/10.4103%2F1673-5374.360289>

Jurk D., Wang C., Miwa S., Maddick M., Korolchuk V., Tsolou A., Gonos A. S., Thrasivoulou C., Saffrey S. M., Cameron K. *et al.* (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*, 11(6):996-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x>

Kaeberlein M., Hu D., Kerr E. O., Tsuchiya M., Westman E. A., Dang N., Fields S., Kennedy B. K. (2005). Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *Public Library of Science Genetics*, 1(5): e69. <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pgen.0010069>

Kaeberlein M., Powers R. W., Steffen K. K., Westman E. A., Hu D., Dang N., Kerr E. O., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751):1193-6. <https://doi.org/10.1126/science.1115535>

Kaeberlein T. L., Smith E. D., Tsuchiya M., Welton K. L., Thomas J. H., Fields S., Kennedy B. K., Kaeberlein M. (2006). Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell*, 5(6):487-94. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00238.x>

Kamath R. S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser A. G., Ahringer J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, 2(1):RESEARCH0002. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-2-1-research0002>

Kamath R. S., Ahringer J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30(4):313-21. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00050-1](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00050-1)

Kapahi P., Chen D., Rogers A. N., Katewa S. D., Li P. W-L., Thomas E. L., Kockel L. (2010). With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metabolism*, 11(6):453-65. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.001>

Kapahi P., Zid B. M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology*, 14(10):885-90. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>

Katewa S. D., Kapahi P. (2011). Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 46(5):382-90. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.11.036>

Kaur S. J., McKeown S. R., Rashid S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, 577(2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>

Kaushik S., Arias E., Kwon H., Lopez N. M., Athonvarangkul D., Sahu S., Schwartz G. J., Pessin J. E., Singh R. (2012). Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *European Molecular Biology Organization Reports*, 13(3):258-65. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.260>

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454):461-4. <https://doi.org/10.1038/366461a0>

Keogh M. J., Chinnery P. F. (2015). Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(11):1401-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.015>

Kern A., Behl C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10):1124-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.016>

Kesidou E., Lagoudaki R., Touloumi O., Poulatsidou K-N., Simeonidou C. (2013). Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural regeneration research*, 8(24): 2275–2283. <https://doi.org/10.3969%2Fj.issn.1673-5374.2013.24.007>

Khandekar A. (2015). Age-related Changes in the Neuronal Architecture of *Caenorhabditis elegans*: A Dissertation. <http://dx.doi.org/10.13028/M2M88H>

Klass M., Hirsh D. (1976). Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 260(5551):523-5. <https://doi.org/10.1038/260523a0>

Koentjoro B., Park J. S., Sue, C. M. (2017). Nix restores mitophagy and mitochondrial function to protect against PINK1/parkin-related Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 7:44373. <https://doi.org/10.1038/srep44373>

Kraytsberg Y., Kudryavtseva E., McKee A. C., Geula C., Kowall N. W., Khrapko K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature Genetics*, 38(5):518-20. <https://doi.org/10.1038/ng1778>

Kregel K. C., Zhang H. J. (2006). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1):R18-36. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2006>

Kumar A., Kumar V., Singh K., Kumar S., Kim Y-S., Lee Y-M., Kim J-J. (2020). Therapeutic advances for Huntington's disease. *Brain Sciences*, 10(1), 43. <https://doi.org/10.3390/brainsci10010043>

Kumar A., Ratan R. (2016). Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. *Journal of Huntington's disease*, 5(3): 217–237. <https://doi.org/10.3233%2FJHD-160205>

Lakowski B., Hekimi S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22):13091-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13091>

Lamming D. W. (2016). Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Rapamycin and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5): a025924. <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a025924>

Lan J., Zhang X., Chen D. (2015). Molecular mechanisms of dietary restriction in aging—insights from *Caenorhabditis elegans* research. *Science China Life Sciences*, 58(4):352-8. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4824-5>

Lane M. A., Ingram D. K., Cutler R. G., Knapka J. J., Barnard D. E., Roth G. S. (1992). Dietary restriction in nonhuman primates: progress report on the NIA study. *Annals of the New York Academy of sciences*, 673:36-45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27434.x>

Lapierre L. R., Kumsta C., Sandri M., Ballabio A., Hansen M. (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy*, 11(6):867-80. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034410>

Lee E-H. (2012). Review of the psychometric evidence of the perceived stress scale. *Asian Nursing Research*, 6(4):121-7. <https://doi.org/10.1016/j.amr.2012.08.004>

Lee G. D., Wilson M. A., Zhu M., Wolkow C. A., de Cabo R., Ingram D. K., Zou S. (2006). Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 5(6):515-24. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x>

Lee H-G., Ogawa O., Zhu X., O'Neill M. J., Petersen R. B., Castellani R. J., Ghanbari H., Perry G., Smith M. A. (2004). Aberrant expression of metabotropic glutamate receptor 2 in the vulnerable neurons of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 07(4):365-71. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0820-8>

Lee M. B., Hill C. M., Bitto A., Kaeberlein M. (2021). Antiaging diets: Separating fact from fiction. *Science*, 374(6570):eabe7365. <https://doi.org/10.1126/science.abe7365>

Leidal A., Levine A., Debnath J. (2018). Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nature Cell Biology*, 20(12):1338-1348. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0235-8>

Leiser S. F., Begun A., Kaeberlein M. (2011). HIF-1 modulates longevity and healthspan in a temperature-dependent manner. *Aging Cell*, 10(2): 318–326. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1474-9726.2011.00672.x>

Lessing D., Bonini N. M. (2009). Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants. *Nature Reviews Genetics*, 10(6):359-70. <https://doi.org/10.1038/nrg2563>

Lim J., Crespo-Barreto J., Jafar-Nejad P., Bowman A. B., Richman R., Hill D. E., Orr H. T., Zoghbi H. Y. (2008). Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature*, 452(7188):713-8. <https://doi.org/10.1038/nature06731>

Lin K., Dorman J. B., Rodan A., Kenyon C. (1997). Daf-16: An hnf-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278(5341):1319-22. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1319>

Lin S. J., Defossez P. A., Guarente L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289(5487):2126-8. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2126>

Lin S. J., Guarente L. (2006). Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *Public Library of Science Genetics*, 2(3):e33. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020033>

Lin X-X., Sen I., Janssens G. E., Zhou X., Fonslow B. R., Edgar D., Stroustrup N., Swoboda P., Yates J. R., Ruvkun G. *et al.* (2018). DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nature Communications*, 9(1):4400. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06624-0>

López-Lluch G., Navas P. (2016). Calorie restriction as an intervention in ageing. *The Journal of Physiology*, 594(8): 2043–2060. <https://doi.org/10.1113%2FJFP270543>

Lopez-Otin C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6): 1194–1217. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2013.05.039>

Magnusson K., Brim B., Das S. (2010). Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2:11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00011>

Mair W., Dillin A. (2008). Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annual review of Biochemistry*, 77:727-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061206.171059>

Martin-Montalvo A., De Cabo R. (2013). Mitochondrial Metabolic Reprogramming Induced by Calorie Restriction. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(3): 310–320. <https://doi.org/10.1089%2Fars.2012.4866>

Mattison J. A., Roth G. S., Lane M. A., Ingram D.K. (2007). Dietary restriction in aging nonhuman primates. *Interdisciplinary Topics in Gerontology and Geriatrics*, 35:137–58. <https://doi.org/10.1159/000096560>

Mattison J. A., Colman R. J., Beasley T. M., Allison D. B., Kemnitz J. W., Roth G. S., Ingram D. K., Weindruch R., de Cabo R., Anderson R. M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys, *Nature Communication*, 17:8:14063. <https://doi.org/10.1038/ncomms14063>

McCampbell A., Taye A. A., Whitty L., Penney E., Steffan J. S., Fischbeck K. H. (2001). Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26):15179-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.261400698>

McCampbell A., Taylor J. P., Taye A. A., Robitschek J., Li M., Walcott J., Merry D., Chai Y., Paulson H., Sobue G., Fischbeck K. H. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Human Molecular Genetics*, 9(14):2197-202. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.14.2197>

McCay C. M., Crowell M. F., Maynard L. A. (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Journal of nutrition*, 10:63–79. <https://doi.org/10.1093/JN%2F10.1.63>

McElwee J. J., Schuster E., Blanc E., Thomas J. H., Gems D. (2004). Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43):44533-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.m406207200>

McKee A. C., Cantu R. C., Nowinski C. J., Hedley-Whyte E. T., Gavett B. E., Budson A. E., Santini V. E., Lee H-S., Kubitius C. A., Stern R. A. (2009). Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68(7):709-35. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181a9d503>

McKinnon P. J. (2013). Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature Neuroscience*, 16(11): 1523–1529. <https://doi.org/10.1038%2Fnn.3537>

Melentijevic I., Toth M. L., Arnold M. L., Guasp R. J., Harinath G., Nguyen K. C., Taub D., Parker J. A., Neri C., Gabel C. V. *et al.* (2017). *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature*, 542(7641):367-371. <https://doi.org/10.1038/nature21362>

Merksamer P. I., Liu Y., He W., Hirschey M. D., Chen D., Verdin E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5(3):144-50. <https://doi.org/10.18632/aging.100544>

Michelitsch M. D., Weissman, J. S. (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22):11910-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11910>

Mishizen-Eberz A. J., Rissman R. A., Carter T. L., Ikonovic M. D., Wolfe B. B., Armstrong D. M. (2004). Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of Disease*, 15(1):80-92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.09.016>

Morigaki R., Goto S. (2017). Striatal Vulnerability in Huntington's Disease: Neuroprotection Versus Neurotoxicity. *Brain Sciences*, 7(6):63. <https://doi.org/10.3390/brainsci7060063>

Morley J. F., Brignull H. R., Weyers J. J., Morimoto R. I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16): 10417–10422. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.152161099>

Morrison B., Hof P., Morrison J. (1998). Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*, 44:32-44. <https://doi.org/10.1002/ana.410440706>

Morrison J. H. (1993). Differential vulnerability, connectivity, and cell typology. *Neurobiology of Aging*, 14(1):51-4. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90021-3)

Most J., Tosti V., Redman L. M., Fontana L. (2017). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Research Reviews*, 39:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005>

Murphy C. T., McCarroll S. A., Bargmann C. I., Fraser A., Kamath R. S., Ahringer J., Li H., Kenyon C. (2003). Genes that act downstream of daf-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, 424(6946):277-83. <https://doi.org/10.1038/nature01789>

Nicolás-Ávila J. A., Lechuga-Vieco A. V., Esteban-Martínez L., Sánchez-Díaz M., Díaz-García E., Santiago D. J., Rubio-Ponce A., Li J. L. Y., Balachander A., Quintana J. A. *et al.* (2020). A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell*, 183(1):94-109.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.031>

Nussbaum-Krammer C., Morimoto R. (2014). *Caenorhabditis elegans* as a model system for studying non-cell-autonomous mechanisms in protein-misfolding diseases. *Disease models & mechanisms*, 7(1): 31–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.013011>

Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G. I., Lee L., Tissenbaum H. A., Ruvkun G. (1997). The fork head transcription factor daf-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, 389(6654):994-9. <https://doi.org/10.1038/40194>

O'Keefe J. H., Torres-Acosta N., O'Keefe E. L., Saeed I. M., Lavie C. J., Smith S. E., Ros E. (2020). A pesco-Mediterranean diet with intermittent fasting: JACC Review Topic of the Week. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(12):1484-1493. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.07.049>

Olney J. W., Fuller T., de Gubareff T. (1979). Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. *Brain Research*, 176(1):91-100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90872-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90872-2)

Osborne T. B., Mendel C. B., Ferry E.R. (1917). The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats. *Science*, 45:294–5. <https://doi.org/10.1126/science.45.1160.294>

Panowski S.H., Wolff S., Aguilaniu H., Durieux J., Dillin A. (2007). PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature*, 447(7144):550-5. <https://doi.org/10.1038/nature05837>

Park S. K., Link C. D., Johnson T. E. (2010). Life-span extension by dietary restriction is mediated by NLP-7 signaling and coelomocyte endocytosis in *C. elegans*. *FASEB Journal*, 24(2):383-92. <https://doi.org/10.1096/fj.09-142984>

Partridge L., Piper M.D., Mair W. (2005). Dietary restriction in *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(9):938-50. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.023>

Powers R. W., Kaeberlein M., Caldwell S. D., Kennedy B. K., Fields S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes and Development*, 20(2):174-84. <https://doi.org/10.1101/gad.1381406>

Pramatarova A., Laganière J., Roussel J., Brisebois K., Rouleau G. A. (2001). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. *The Journal of Neuroscience*, 21(10): 3369–3374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03369.2001>

Raizen D. M., Lee R. Y., Avery L. (1995). Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 141(4):1365-82. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.4.1365>

Rango C., Whitfield C. W., Rodal A., Kim S. K., Kaplan J. M. (1998). LIN-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia. *Cell*, 94(6):751-9. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81734-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81734-1)

Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J. E., Luo S., Oroz L. G., Scaravilli F., Easton D. F., Duden R., O'Kane C. J. *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, 36(6):585-95. <https://doi.org/10.1038/ng1362>

Reiner A., Dragatsis I., Dietrich P. (2011). Genetics and neuropathology of Huntington's disease. *International Review of Neurobiology*, 98, 325–372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381328-2.00014-6>

Ribeiro C., Dickson B. J. (2010). Sex peptide receptor and neuronal TOR/S6K signaling modulate nutrient balancing in *Drosophila*. *Current Biology*, 20(11):1000-5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.061>

Riddle D. L., Swanson M. M., Albert P. S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*, 290(5808):668-71. <https://doi.org/10.1038/290668a0>

Rose C., Menzies F. M., Renna M., Acevedo-Arozena A., Corrochano S., Sadiq O., Brown S. D., Rubinsztein D. C. (2010). Rilmenidine attenuates toxicity of polyglutamine expansions in a mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(11):2144-53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq093>

Roth D. M., Balch W. E., (2011). Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(2):126-34. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.11.001>

Rudich P., Watkins S., Lamitina T. (2020). PolyQ-independent toxicity associated with novel translational products from CAG repeat expansions. *Public Library of Science one*, 15(4): e0227464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227464>

Rudnick N. D., Griffey C. J., Guarnieri P., Gerbino V., Wang X., Piersaint J. A., Tapia J. C., Rich M. M., Maniatis T. (2017). Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(39):E8294-E8303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704294114>

Sandoval L. E., Jiang H., Wang D. (2019). The Dietary Restriction-Like Gene *drl-1*, Which Encodes a Putative Serine/Threonine Kinase, Is Essential for Orsay Virus Infection in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Virology*, 93(3): e01400-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01400-18>

Sarkis G. J., Ashcom J. D., Hawdon J. M., Jacobson L. A. (1988). Decline in protease activities with age in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 45(3):191-201. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(88\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0047-6374(88)90001-2)

Sasaki S. (2011). Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70(5):349-59. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3182160690>

Saudou F., Humbert S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>

Saxena S., Roselli F., Singh K., Leptien K., Julien J-P., Gros-Louis F., Caroni P. (2013). Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron*, 80(1):80-96. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.027>

Schapira A. H., Mann V. M., Cooper J. M., Krige D., Jenner P. J., Marsden C. D. (1992). Mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Annals of Neurology*, 32:116-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410320720>

Selkoe D., Hardy J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *European Molecular Biology Organization Molecular Medicine*, 8(6): 595–608. <https://doi.org/10.15252%2Femmm.201606210>

Settembre C., Ballabio A. (2011). TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy*, 7(11):1379-81. <https://doi.org/10.4161/auto.7.11.17166>

Shivers J., Uppaluri S., Brangwynne C. P. (2017). Microfluidic immobilization and subcellular imaging of developing *Caenorhabditis elegans*. <https://doi.org/10.1101/139915>

Siddique I, Di J., Williams C. K., Markovic D., Vinters V. H., Bitan G. (2021). Exophers are components of mammalian cell neurobiology in health and disease. *bioRxiv*, 2021.2012.2006.471479, <https://doi.org/10.1101/2021.12.06.471479>

Simonsen A., Cumming R. C., Brech A., Isakson P., Schubert D. R., Finley K. D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*, 4(2):176-84. <https://doi.org/10.4161/auto.5269>

Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8): 1583. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules24081583>

Souza R. J., Swain J. F., Appel L. J., Sacks F. M. (2008). Alternatives for macronutrient intake and chronic disease: a comparison of the OmniHeart diets with popular diets and with dietary recommendations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1):1-11. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.1.1>

Sperling R. A., Laviolette P. S., O'Keefe K., O'Brien J., Rentz D. M., Pihlajamaki M., Marshall G., Hyman B. T., Selkoe D. J., Hedden T. *et al.* (2009). Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron*, 63(2):178-88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.003>

Stadtman E. R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9):1105-12. <https://doi.org/10.2174/0929867043365341>

Steinkraus K. A., Smith E. D., Davis C., Carr D., Rendergrass W. R., Sutphin G. L., Kennedy B. K., Kaerberlein M. (2008). Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 7(3):394-404. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00385.x>

Stout G. J., Stigter E. C. A., Essers P. B., Mulder K. W., Kolkman A., Snijders D. S., Van Den Broek N. J. F., Betist M. C., Korswagen H. C., MacInnes A. W. (2013). Insulin/igf-1-mediated longevity is marked by reduced protein metabolism. *Molecular Systems Biology*, 9:679. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.35>

Suku M., Forrester L., Biggs M., Monaghan M. G. (2021). Resident Macrophages and Their Potential in Cardiac Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(3):579-591. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0036>

Sulston J. E., Horvitz H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 56(1):110-56. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)

Sulzer D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 30(5):244-50. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.009>

Surmeier J., Obeso J., Halliday G. (2017). Parkinson's Disease Is Not Simply a Prion Disorder. *The Journal of Neuroscience*, 37(41):9799-9807. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1787-16.2017>

Szczygielski J., Mautes A., Steudel W. I., Falkai P., Bayer T. A., Wirths O. (2005). Traumatic brain injury: cause or risk of Alzheimer's disease? A review of experimental studies. *Journal of Neural Transmission*, 112(11):1547-64. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0326-0>

Takahashi T., Katada S., Onodera O. (2010). Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *The Journal of Molecular Cell Biology*, 2(4):180-91. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq005>

Tanaka K., Matsuda N. (2014). Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(1):197-204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.012>

Tanaka M., Machida Y., Niu S., Ikeda T., Jana N. R., Doi H., Kurosawa M., Nekooki M., Nukina N. (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 10(2):148-54. <https://doi.org/10.1038/nm985>

Tanenbaum B., Taft J. (2013). Maintaining good nutrition with ALS: A guide for people with ALS, families and friends. *ALS association*. <https://www.als.org/sites/default/files/2020-04/Maintaining%20good%20nutrition%20with%20ALS.pdf>

Tatar M. (2004). The neuroendocrine regulation of Drosophila aging. *Experimental Gerontology*, 39(11-12):1745-50. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.06.024>

Taufenberger A., Vaccaro A., Aulas A., Vande Velde C., Parker J. A. (2012). Glucose delays age-dependent proteotoxicity. *Aging cell*, 11(5): 856–866. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1474-9726.2012.00855.x>

Therrien M., Parker J. A. (2014). Worming forward: Amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Genetics*, 5, 85. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00085>

Timmons L. Court D. L., Fire A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1-2):103-12. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00579-5)

Timmons L., Fire A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705):854. <https://doi.org/10.1038/27579>

Todorovic S. T., Smiljanic K. R., Ruzdijic S. D., Mladenovic Djordjevic A. N., Kanazir S. D. (2018). Effects of Different Dietary Protocols on General Activity and Frailty of Male Wistar Rats During Aging. *The Journals of Gerontology*, 73(8): 1036–1044. <https://doi.org/10.1093%2Fgerona%2Fgly015>

Tomiyama M., Kimura T., Maeda T., Tanaka H., Furusawa K., Kurahashi K., Matsunaga M. (2001). Expression of metabotropic glutamate receptor mRNAs in the human spinal cord: implications for selective vulnerability of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 189(1-2):65-9. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00561-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00561-5)

Touroutine D. et Tanis J. E. (2020). A Rapid, SuperSelective Method for Detection of Single Nucleotide Variants in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 216(2):343-352. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303553>

Turner M.R., Hardiman O., Benatar M., Brooks B. R., Chio A., de Carvalho M., Kiernan M. C. (2013). Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*, 12(3), 310–322. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70036-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70036-X)

Vandoorne T., De Bock K., Van Den Bosch L. (2018). Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathologica*, 35(4): 489–509. <https://doi.org/10.1007%2Fs00401-018-1835-x>

Vargas M. A., Luo N., Yamaguchi A., Kapahi P. (2010). A role for S6 kinase and serotonin in postmating dietary switch and balance of nutrients in *D. melanogaster*. *Current Biology*, 20(11):1006-11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.009>

Verma M., Wills Z., Chu C. T. (2018). Excitatory Dendritic Mitochondrial Calcium Toxicity: Implications for Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in neuroscience*, 12:523. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00523>

Vermeer S. E., Prins N. D., den Heijer T., Hofman A., Koudstaal P. J., Breteler M. M. B. (2003). Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *The New England Journal of Medicine*, 348(13):1215-22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa022066>

Wang J., Barr M. M (2005). RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Enzymology*, 392:36-55. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(04\)92003-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(04)92003-4)

Wang J., Zhang Y., Cao J., Wang Y., Anwar N., Zhang Z., Zhang D., Ma Y., Xiao Y., Xiao L. *et al.* (2023). The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance. *Autophagy*. 19(9):2409-2427. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2186112>

Wang Y., Xu E., Musich P. R., Lin F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(7): 816–824. <https://doi.org/10.1111%2Fncs.13116>

Weindruch R., Walford R. (1988). The retardation of aging and disease by dietary restriction. *Journal of nutrition*, 116(4):641-54. <https://doi.org/10.1093/jn/116.4.641>

White J. G. J. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions. Biological sciences*, 314(1165):1-340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>

Williams A. J., Paulson H. L. (2008). Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends in Neurosciences*, 31(10):521-8. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.07.004>

Winklhofer K. F., Tatzelt J., Haass C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *European Molecular Biology Organization Journal*, 27(2):336-49. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601930>

Wyss-Coray T. (2016). Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 539(7628):180-186. <https://doi.org/10.1038/nature20411>

Xia P., Chen H-S. V., Zhang D, Lipton S. A. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *The Journal of Neuroscience*, 30(33):11246-50. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2488-10.2010>

Xie Y., Zhou B., Lin M-Y., Wang S., Foust K. D., Sheng Z-H. (2015). Endolysosomal Deficits Augment Mitochondria Pathology in Spinal Motor Neurons of Asymptomatic fALS Mice. *Neuron*, 87(2):355-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.026>

Yanase S., Onodera A., Tedesco P., Johnson T. E., Ishii N. (2009). SOD-1 deletions in *Caenorhabditis elegans* alter the localization of intracellular reactive oxygen species and show molecular compensation. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(5), 530–539. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp020>

Yang Y., Arnold M. L., Choy E. H., Lange C. M., Poon K., Broussalian M., Sun L-H., Moreno T. M., Singh A., Driscoll M. *et al.* (2022). Inhibition of early-acting autophagy genes in *C. elegans* neurons improves protein homeostasis, promotes exopher production, and extends lifespan via the ATG-16.2 WD40 domain. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2022.12.12.520171>

Zeron M. M., Hansson O., Chen N., Wellington C. L., Leavitt B. R., Brundin P., Hayden M. R., Raymond L. A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, 33(6):849-60. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00615-3)

Zhang K., Shi P., An T., Wang Q., Wang J., Li Z., Duan W., Li C., Guo Y. (2013). Food restriction-induced autophagy modulates degradation of mutant SOD1 in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Brain Research*, 1519:112-9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.050>

Zhang S., Binari R., Zhou R., Perrimon N. (2010). A genomewide RNA interference screen for modifiers of aggregates formation by mutant Huntingtin in *Drosophila*. *Genetics*, 184(4):1165-79. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.112516>

Zhang X., Li L., Chen S., Yang D., Wang Y., Zhang X., Wang Z., Le W. (2011). Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*, 7(4):412-25. <https://doi.org/10.4161/auto.7.4.14541>

Zhang Y., Shao Z., Zhai Z., Shen C., Powell-Coffman J. A. (2009). The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *Public Library of Science One*, 4(7):e6348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006348>

Zhao J., Wang X., Huo Z., Chen Y., Liu J., Zhao Z., Meng F., Su Q., Bao W., Zhang L. *et al.* (2022). The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 11(13): 2049. <https://doi.org/10.3390%2Fcells11132049>