

*Caractérisation épigénétique et phénotypique
du vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*,
le Killifish turquoise*

Aurélien Henet

Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de Master
en Biologie des Organismes et Écologie

Promoteur

Frédéric Silvestre

Encadrant

Antoine Wittorski

Travail réalisé à l'Université de Namur au sein du Laboratoire de
Physiologie Adaptative et Evolution (LEAP)

2019-2020

Epigenetics and phenotypic characterization of aging in *Nothobranchius furzeri*, the turquoise killifish

Abstract

Aging is a common phenomenon in the reign of life. This inevitable process is still enigmatic and not well understood. Epigenetics is an interesting biological field useful for studying this process. It is the study of all hereditary variations of gene expressions that do not involve variations in the genetic code. In order to carry out an epigenetic study of aging, an ideal biological model can be seen in the African fish species: *Nothobranchius furzeri*, the turquoise killifish. This fish is the vertebrate species with the shortest lifespan known to date and goes through all the biological stages that vertebrates go through within 3 to 6 months.

This master thesis aims to characterize epigenetic markers and phenotypes associated with aging in *Nothobranchius furzeri*.

Firstly, a phenotypic study was carried out on the whole life of fifteen killifish of GRZ strain. This study allowed to draw up a behavioural and morphological frame of reference at different stages of their life. A high inter-individual variability in responses to behavioural tests was highlighted and raise probabilities for the existence of personality traits or behavioural plasticity in this species. Behavioural variability has been established between different life stages and may reflect an increase of boldness, as well as a decrease in locomotion in aged individuals. This variability can also be explained by a habituation over time to behavioural tests, which suggests the existence of learning abilities in this fish. Analysis of individuals' mortality has suggested an increase in the life expectancy of the GZR strain in laboratories in the current days.

Secondly, the study of an important epigenetic mechanism, CpG methylation, was carried out on two organs from two differently aged groups of five males. Six different gene sequences were successfully analysed. Moreover, the methylation of a non-CpG cytosine has been detected. This non-CpG methylation stands in a gene which appears to be of interest for a study of brain aging.

This master thesis allowed the characterization of several aspects of *Nothobranchius furzeri*'s aging in our laboratory. This is a preliminary step to future studies which will be carried out on this biological model.

Caractérisation épigénétique et phénotypique du vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*, le Killifish turquoise

Résumé

Le vieillissement est un phénomène omniprésent dans le règne de la vie. Ce processus inévitable est encore à l'heure actuelle énigmatique et trop peu connu. Un champ biologique particulièrement intéressant pour étudier ce processus est l'épigénétique, l'étude de l'ensemble des variations héréditaires d'expressions et d'activités géniques qui ne font pas intervenir de variations dans le code génétique. Afin de réaliser une étude épigénétique du vieillissement, un modèle biologique idéal peut être vu dans l'espèce de poisson africaine : *Nothobranchius furzeri*, le killifish turquoise. Ce poisson est l'espèce vertébrée possédant le cycle de vie le plus court connu à ce jour et passe par toutes les étapes biologiques caractéristiques des vertébrés en l'espace de 3 à 6 mois.

Ce mémoire a pour objectif de caractériser des marqueurs épigénétiques et des phénotypes associés au vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*.

Premièrement, une étude phénotypique a été élaborée sur l'entièreté de la vie de quinze killifish turquoise mâles de souche de laboratoire GRZ, ce qui a permis d'élaborer un référentiel comportemental et morphologique à différents stades de leur vie. Une variabilité inter-individuelle élevée dans les réponses aux tests comportementaux réalisés a été mise en évidence et évoque l'existence de traits de personnalité ou de plasticité comportementale chez cette espèce. Une variabilité des réponses aux tests a été établie entre les différents stades de vie étudiés et peut refléter une augmentation de l'audace des individus vieillissants, ainsi qu'une diminution de leurs capacités de locomotion. Elle peut également être expliquée par une habitude aux tests avec le temps ce qui suggère l'existence d'une forme d'apprentissage chez ce poisson. L'analyse de la mortalité des individus a permis de suggérer une augmentation de l'espérance de vie de la souche GZR en laboratoire à l'heure actuelle.

En parallèle, l'étude d'un mécanisme épigénétique important, la méthylation CpG, a été réalisée sur plusieurs séquences géniques de deux organes de deux groupes de cinq mâles de deux âges différents. Six séquences géniques différentes ont pu être analysées. De plus, La méthylation d'une cytosine non-CpG a été mise en évidence et la séquence génique dans laquelle elle a été détectée s'avère être particulièrement intéressante pour une étude du vieillissement cérébral du poisson.

Ce mémoire a permis la caractérisation de plusieurs aspects du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* dans notre laboratoire, étape préliminaire aux futures études qui y seront réalisées sur ce modèle.

Table des matières

Introduction.....	1
1. Le vieillissement	3
2. L'épigénétique.....	8
2.1. La méthylation	10
2.2. Liens entre épigénétique et vieillissement	12
3. Modèles d'études du vieillissement	13
4. <i>Nothobranchius furzeri</i>	14
5. Objectif de ce mémoire	18
5.1. Objectifs spécifiques	18
5.1.1. Etablissement d'un référentiel épigénétique.....	18
5.1.2. Etablissement d'un référentiel phénotypique	18
Matériel et méthode.....	19
1. Elevage et maintien de la lignée de killifish	19
1.1. Système d'élevage	19
1.2. Maintien de la lignée.....	19
2. Caractérisation phénotypique de <i>Nothobranchius fuzeri</i>	22
2.1. Analyse comportementale.....	22
2.1.1. Test d'openfield	23
2.1.2. Shelter test	24
2.1.3. Analyse des vidéos	25
2.2. Prise des mesures morphologiques	25
2.2.1. Pesée	26
2.2.2. Mesure de la taille.....	26
3. Caractérisation épigénétique de <i>Nothobranchius fuzeri</i>	27
3.1. Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêt	27
3.2. Extraction du matériel biologique.....	27
3.3. Pyroséquençage.....	27
4. Statistiques	28
4.1. Analyse des variables comportementales	28

4.2. Analyse des variables morphologiques.....	30
4.3. Analyse des pourcentages de méthylation	30
Résultats.....	31
1. Mortalité.....	31
2. Variables morphologiques.....	32
3. Variables comportementales	34
3.1. Variables communes aux deux tests	34
3.2. Variables spécifiques à chaque test.....	51
3.2.1. Open field	51
3.2.2. Shelter test	56
3.3. Résumé des tendances comportementales	66
4. Caractérisation épigénétique	67
4.1. Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêt	67
4.2. Méthylations des gènes d'intérêts	69
Discussion.....	77
1. Taux de survie	77
2. Caractérisation comportementale	79
2.1. Variabilité inter-individuelle.....	79
2.2. Variabilité entre répliques	81
2.2.1. Habituation	81
2.2.2. Sensibilisation.....	82
2.3. Variabilité entre les différents stades de vie	83
2.3.1. Locomotion.....	83
2.3.2. Audace	84
3. Caractérisation épigénétique	86
3.1. GFAP	86
3.2. TET2	87
3.3. SIRT1.....	88
3.4. NFE2l2a	89
Conclusion	90
Perspectives.....	91
Remerciements	91
Bibliographie.....	92
Annexes	102

Introduction

Depuis des centaines d'années, l'homme s'interroge quant à l'origine de l'existence et de la diversité du vivant. Certains philosophes grecs avaient déjà émis des hypothèses quant à cette origine et parmi celles-ci se retrouvait le concept d'évolution, l'évolution d'organismes en d'autres organismes (Kutschera & Niklas, 2004).

Il faut attendre les 18^{ème} et 19^{ème} siècles pour que ce concept soit approfondi. Charles Darwin et Alfred Russel Wallace sont les deux scientifiques principaux ayant apporté publiquement le concept d'évolution progressive, graduelle et de transformation continue des organismes. Ce nouveau concept d'évolution fait sous-entendre qu'un ensemble d'organismes descend d'un ancêtre commun unique. Cet ancêtre s'est transformé progressivement et différenciellement en différents organismes, ce qui a donné différentes espèces propres (Kutschera & Niklas, 2004).

Après la publication de ces théories, de nombreux scientifiques se sont attelés à comprendre et à prouver cette évolution continue du vivant. « L'origine des espèces » de Charles Darwin a été le moteur le plus puissant derrière cette nouvelle vague d'études, ce qui a eu pour conséquence de nommer cette façon de voir l'évolution « le Darwinisme ». Dans ce courant de pensée, la sélection naturelle est la force motrice principale de l'évolution. La sélection naturelle est un concept qui explique que l'environnement influence l'évolution des organismes et qui va de pair avec le concept d'adaptation. En effet, en s'adaptant, certains organismes pourraient acquérir de nouveaux phénotypes au fil des générations, leur permettant d'être mieux adaptés à leur environnement. Grâce à ces adaptations, ces individus vont pouvoir survivre plus aisément dans cet environnement. L'adaptation acquise est héréditaire ; en conséquence, les descendants des individus adaptés posséderont cette adaptation. Leur nombre augmentera progressivement au fil des générations pendant que les espèces non-adaptées déclineront, jusqu'à disparaître de l'environnement (Ho & Saunders, 1979; Kutschera & Niklas, 2004).

Le Darwinisme s'est basé principalement sur des observations morphologiques d'espèces vivantes et de fossiles mais par la suite, le néo-Darwinisme est apparu. Il consiste en une complexification du Darwinisme et y ajoute un aspect de variabilité génétique. Dans ce courant de pensée, les vrais moteurs derrière l'évolution sont les causes de l'existence de la variabilité biologique comme la reproduction sexuelle ou les mutations. La variabilité biologique est créée et c'est seulement après que la sélection naturelle entre en jeu et détermine le cours de l'évolution (Ho & Saunders, 1979; Kutschera & Niklas, 2004).

Lorsque ces bases ont été mises en place, les scientifiques se sont attelés à comprendre l'évolution dans son ensemble et sous tous ses aspects. En conséquence, un nombre croissant d'études se sont développées dans différents domaines comme la génétique, la paléontologie, la systématique ou encore la microbiologie. L'amas considérable de ces nouvelles connaissances a pu permettre de mettre en évidence de nombreux liens entre les différentes branches de la biologie qui étaient étudiées séparément à cette époque. Cet assemblage de découvertes a été renommé : « La Théorie Synthétique » de l'évolution (Ayala, 1982; Kutschera & Niklas, 2004).

Depuis l'élaboration de cette théorie, l'évolution est devenue un concept omniprésent dans les études en biologie. Cette théorie globale a permis d'expliquer l'apparition et le développement d'innombrables phénomènes et processus dans le monde du vivant, que cela soit à l'échelle génétique et moléculaire comme l'apparition de la duplication du génome (Kellis *et al.*, 2004), à l'échelle cellulaire avec la théorie de l'endosymbiose (Martin *et al.*, 2015), à l'échelle physiologique et de l'organisme via les adaptations d'un organisme à son milieu, ou encore à une échelle écologique dans les études de dynamiques de populations (Allen *et al.*, 2017). Outre le fait d'être devenue une branche de la biologie à part entière, elle est devenue un outil puissant pour expliquer et comprendre. Elle est devenue un concept qui est en permanence étudié, peaufiné et qui englobe la plupart des autres aspects biologiques.

L'évolution est donc devenue un outil, notamment pour essayer de répondre à des questions sur la raison et l'utilité de l'apparition de plusieurs processus biologiques comme la reproduction sexuée (Heitman *et al.*, 2013) ou encore la symbiose (Norris, 1996). Cependant, de nombreuses questions intriguent encore les scientifiques. Par exemple, certains s'interrogent quant à l'origine et l'utilité de l'apparition et du développement de reproductions sexuelles particulières. Un exemple est la polyandrie que l'on retrouve chez de nombreux poissons et qui consiste en la reproduction d'une femelle avec plusieurs mâles. Un autre exemple est le questionnement sur l'existence de l'haplo-diploïdie qui est un phénomène présent chez les insectes sociaux comme les abeilles. L'haplo-diploïdie consiste en la ponte d'œufs fécondés qui donnent des femelles ou bien d'œuf non fécondés qui donnent des mâles. (Aamidor *et al.*, 2018). Un dernier exemple est le questionnement sur l'existence de l'hermaphrodisme qui consiste au fait de porter les deux sexes, fonctionnels. On le retrouve particulièrement chez des invertébrés comme l'escargot ou le vers de terre, mais également chez une espèce de poissons particuliers appelés killifish des mangroves (Avisé & Tatarenkov, 2015).

Ces questions ont pour trait commun le fait de perpétuer l'espèce, de maximiser le fitness d'un individu, l'efficacité avec laquelle il transmet ses gènes. L'individu s'adapte à son milieu, maximise ses chances de se reproduire, contribue à perpétuer l'espèce. Mais qu'en est-il une fois la reproduction accomplie ? Lorsque l'individu s'est reproduit suffisamment, il pourrait simplement mourir, laisser la place aux générations suivantes. Or, un phénomène complexe est observé avant la mort de l'individu dans la quasi-totalité des taxons du vivant : un déclin progressif de l'organisme, le vieillissement. Plusieurs questions peuvent se poser quant à l'origine, le but ou l'utilité du vieillissement. Quels processus sont impliqués dans son développement et pour quelles raisons ? Comment se déclenche-t-il ? Y a-t-il des processus capables d'influer sur ce déclenchement ? Pour mieux répondre à ces questions, il convient de mieux décrire ce phénomène.

1. Le vieillissement

Vieillir consiste en un complexe de changements anatomiques, physiologiques, biochimiques et génétiques par lesquels chaque organisme passe durant son existence (Calvanese *et al.*, 2009). Bien qu'omniprésent dans le règne de la vie, ce processus inévitable est encore à l'heure actuelle énigmatique et trop peu connu. De nombreux chercheurs essaient de découvrir et de comprendre les mécanismes biologiques qui lui sont inhérents.

De ce fait, le vieillissement a été caractérisé par neuf grands processus biologiques distincts (Figure 1): une instabilité génomique, une attrition des télomères, des altérations épigénétiques, une perte de la protéostase, une dérégulation de la détection de nutriments, des dysfonctions mitochondriales, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire (López-Otín *et al.*, 2013).

Puisque le vieillissement touche toutes les échelles biologiques (génétique, cellulaire, de l'organisme, des populations,...), plusieurs définitions spécifiques au domaine d'étude sont utilisées pour le caractériser. D'un point de vue évolutionnaire, le vieillissement peut être défini comme une diminution progressive du fitness et de la fécondité en association avec une augmentation de la mortalité, après une certaine période de vie (Heid, 2018). Pour prendre un exemple de définition plus spécifique, le vieillissement cognitif peut être défini comme une diminution progressive de certaines capacités cognitives comme la rapidité de traitement d'informations ou encore la capacité mémorielle, en association avec des modifications neuro-anatomiques (Salthouse, 2010). Certaines caractéristiques du vieillissement sont reprises dans



Figure 1 : Ce schéma énumère les neuf processus décrits dans cette introduction : une instabilité génomique, une attrition des télomères, des altérations épigénétiques, une perte de la protéostase, une dérégulation de la détection de nutriments, des dysfonctions mitochondriales, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire (López-Otín *et al.*, 2013).

la majorité de ces définitions et ce processus peut être globalement défini comme le déclin général des fonctionnalités biologiques (Childs *et al.*, 2015 ; Heid, 2018).

Alors que l'on est capable de donner une définition du vieillissement, on pourrait se poser la question de son but. Le vieillissement est un processus désavantageux pour un organisme, le conduisant progressivement vers sa mort. En connaissant le principe de sélection naturelle, on pourrait estimer que les gènes responsables d'un tel processus devraient avoir été contre-sélectionnés. Or ils existent.

De nombreuses hypothèses sont élaborées quant à l'origine du vieillissement et peuvent décrire ce phénomène comme le résultat primaire d'un processus évolutif apportant, in fine, un bénéfice à l'espèce (Api *et al.*, 2017). Par exemple, un vieillissement rapide dans une niche écologique permettrait le renouvellement des populations et une accélération de processus évolutifs comme la spéciation qui mène à l'apparition de nouveaux phénotypes et permet à l'espèce de s'adapter plus rapidement à un environnement changeant (Mitteldorf & Martins, 2014). Dans ce cas, un

vieillesse rapide pourrait être sélectionné comme un bon compromis dans l'équilibre de la dynamique des populations apportant le bénéfice d'une adaptation rapide à un environnement changeant.

Une autre possibilité quant à l'origine du vieillissement pourrait être la possibilité d'une dualité dans les effets des gènes responsables de son développement. Par exemple, un gène délétère à un stade de vie d'un individu pourrait avoir un effet totalement différent à un stade de vie antérieur. La théorie de la pléiotropie antagoniste permet d'expliquer ce phénomène. Cette théorie postule qu'en fonction de son stade de vie, certains gènes influencent différenciellement le fitness d'un individu (Tuminello & Han, 2011). Ce postulat permettrait d'expliquer que les gènes pouvant être à l'origine du déclin des fonctionnalités biologiques soient sélectionnés, malgré leurs effets désavantageux. En effet, les gènes dont les effets deviennent délétères avec l'âge apporteraient un bénéfice à l'individu dans les premières parties de son existence, bénéfice surpassant, en termes d'avantages évolutifs, les pertes de fonctions liées au vieillissement. De plus, ces pertes surviennent après une période constituée de nombreuses reproductions. À ce moment, la force de sélection agissant sur le fitness de l'individu est beaucoup faible qu'au début de sa reproduction (Blagosklonny, 2010; Carter & Nguyen, 2011). En d'autres mots, il a récemment été proposé que le vieillissement dépend d'événements développementaux, certains allèles impliqués dans ces événements apportant un avantage pendant le développement et la maturation et pouvant être délétères à un stade de vie plus avancé (Api *et al.*, 2017).

En plus de cette explication par la pléiotropie antagoniste, le vieillissement pourrait être considéré comme le résultat d'un compromis d'allocations énergétiques entre la reproduction et la maintenance des cellules somatique (Valdesalici & Cellerino, 2003). La ressource énergétique totale dont un organisme disposera au cours de sa vie est limitée par plusieurs facteurs. Un de ces facteurs est l'énergie disponible dans l'environnement dans lequel il évolue, soit l'énergie que l'organisme est capable d'assimiler et avec quelle efficacité celui-ci est capable de l'assimiler ou de la conserver (Boggs, 2009). Un autre aspect de limitation de ressources énergétiques peut être vu dans certains facteurs de risque de mortalité (pouvant être déterminés par des interactions avec d'autres organismes ou avec l'environnement) qui peuvent limiter l'assimilation de l'énergie à travers le temps de vie de l'individu (Lemaître *et al.*, 2015). Pour cause de ces limitations, l'énergie absorbée par un organisme ne sera jamais en assez grande quantité pour qu'il puisse assurer toutes ses fonctions biologiques (reproduction, développement, homéostasie,...) à leur plein potentiel. En conséquence, l'organisme alloue certaines quantités d'énergies pour s'assurer de l'optimisation de certaines fonctions

biologiques. Il réalise des compromis d'allocations énergétiques entre différentes fonctions (Figure 2) (Helle, 2008). Le vieillissement peut être vu comme un déclin dans la maintenance somatique, soit le maintien du métabolisme, des fonctions cellulaires. Il pourrait donc être le résultat d'un compromis d'allocations énergétiques entre cette maintenance somatique et la reproduction en association avec la croissance de l'organisme (Kirkwood *et al.*, 1991; Lemaître *et al.*, 2015). En accord avec ce qui a été dit ci-dessus, la limitation environnementale des ressources énergétiques pourrait donc influencer les allocations énergétiques et influencer le vieillissement.

Plusieurs théories peuvent donc expliquer l'origine du vieillissement et ces théories ne s'excluent pas nécessairement. Par exemple, la théorie de l'allocation énergétique peut être compatible avec la théorie de la pléiotropie antagoniste. Mais dans un premier temps, pour essayer d'affirmer la théorie de la pléiotropie antagoniste, il faut s'assurer de l'existence de gènes à l'origine du vieillissement. En effet, ce dernier est bien caractérisé par la modulation de la fonction et de la structure de nombreux gènes (Heid, 2018). En conséquence, de nombreux marqueurs génétiques et moléculaires lui ont été associés. L'étude de ces derniers permet de mieux comprendre ce phénomène et permettent de lui associer différents processus biologiques. Un exemple peut être donné en énonçant le cas du stress oxydatif. Ce processus peut être causé

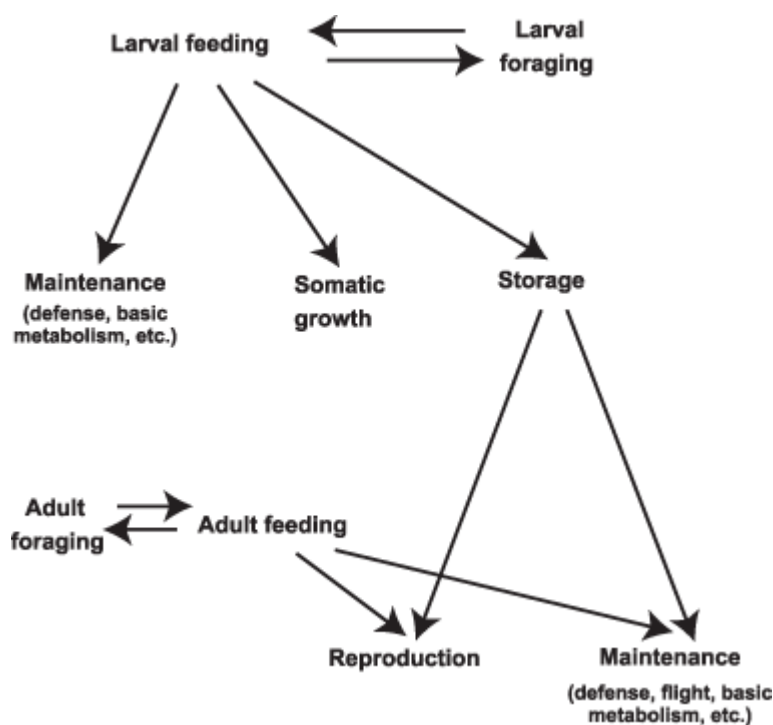


Figure 2 Exemple d'allocation énergétique chez certaines espèces d'insecte. Chaque flèche représente une allocation et est accompagnée d'une perte d'énergie (non représentée) due au manque d'efficacité d'utilisation énergétique (Boggs, 2009)

par la formation de ROS (Reactive Oxygen Species), molécules pouvant causer des dommages moléculaires. La formation de ROS est associée à des dysfonctionnements dans la chaîne de transporteurs d'électrons dans la mitochondrie. Ces dysfonctionnements sont amplifiés lors de la perte d'efficacité respiratoire de la mitochondrie, perte associée au vieillissement. Par ces liens, l'étude du stress oxydatif peut donc permettre d'étudier le vieillissement et vice-versa (Camougrand & Rigoulet, 2001). Cette étude peut se faire par l'analyse de marqueurs génétiques et moléculaires tel que le gène 66^{shc} et son produit, la protéine $p66^{shc}$ (Camougrand & Rigoulet, 2001; Terzibasi *et al.*, 2007). $p66^{shc}$ est une protéine intégratrice dans la transduction de signaux entre la mitochondrie et le cytoplasme. Elle est associée à la surveillance des concentrations cellulaires en ROS ainsi qu'au déclenchement de systèmes de résistance à certains ROS. De par cette particularité et par le lien qu'il est possible de faire avec le vieillissement, 66^{shc} et $p66^{shc}$ peuvent être utilisés comme marqueurs de stress oxydatif et de vieillissement (Camougrand & Rigoulet, 2001).

Comme le stress oxydatif, il existe énormément de pathway et de processus biologiques pouvant être associés au vieillissement. Certains d'entre eux sont utiles pour essayer de comprendre son origine et son but. Un domaine d'étude semble particulièrement intéressant pour essayer de comprendre ce phénomène. Ce domaine est l'épigénétique, qui propose notamment le fait que des facteurs externes peuvent influencer le phénotype d'un individu. Pourquoi deux individus très proches génétiquement, comme deux jumeaux, ne vieillissent pas de la même façon, ni au même moment? L'épigénétique pourrait l'expliquer si ces jumeaux ne vivent pas dans le même environnement et ont subi différentes contraintes environnementales. Plus que ça, l'épigénétique pourrait être vue comme un déclencheur, une cause majeure du vieillissement. Mais avant d'aller plus loin, une définition plus complète de ce phénomène doit être donnée.

2. L'épigénétique

Une définition moderne présente l'épigénétique comme l'ensemble des variations héréditaires d'expressions et d'activités géniques qui ne font pas intervenir de variations dans le code génétique (Calvanese *et al.*, 2009; Kovalchuk, 2012). En d'autres mots, l'épigénétique représente l'ensemble des mécanismes réversibles et héréditaires qui se produisent sans aucune altération dans le code génétique. Dans cette optique, le génome peut être vu comme un porteur d'informations tandis que l'épigénome peut être vu comme le responsable de la bonne utilisation et de la stabilité de ces informations. En conséquence, l'épigénétique permet le lien entre le génotype et le phénotype (Pal & Tyler, 2010). Une des particularités de ce phénomène est le fait que de nombreux facteurs externes au génome, comme des facteurs environnementaux, peuvent influencer l'expression d'un phénotype (Calvanese *et al.*, 2009).

Il existe différentes informations épigénétiques encodées par notre épigénome. Parmi les plus importantes, nous retrouvons la méthylation d'ADN, le remodelage chromatinien, la transcription d'ARNs non-codants, la présence ou l'absence de protéines histones sur n'importe quelle séquence nucléotidique et les modifications post-traductionnelles, ainsi que l'existence de variants structurels et fonctionnels de ces protéines (Figure 3) (Pal & Tyler, 2010; Relton & Smith, 2010).

Le remodelage chromatinien peut modifier l'expression génique en permettant l'accès, ou non, pour divers facteurs de transcription à certaines séquences d'ADN. La condensation de la chromatine en hétérochromatine limite cet accès. Différents acteurs moléculaires peuvent influencer cette condensation mais les protéines histones y sont particulièrement impliquées. En effet, les histones constituent la charpente de la chromatine et certaines modifications de ces protéines influent directement sur l'état de condensation chromatinien. Les deux modifications des histones les plus étudiées sont l'acétylation et la méthylation. Ces modifications peuvent se faire indépendamment de séquences génomiques et peuvent être influencées par des facteurs externes au génome ce qui explique leur caractère épigénétique (Holliday, 2006).

Les ARNs non codant (ncRNA) et plus particulièrement les micro-ARNs (miRNAs) peuvent également modifier l'expression génique. Cependant, le mécanisme par lequel ils agissent diffère de celui des Histones. Tandis que ces dernières agissent directement sur la séquence nucléotidique, les miRNAs ciblent les ARNs messagers et les détruisent ou inhibent leur traduction. Les expressions des gènes codants pour les ncRNAs peuvent être modifiées par

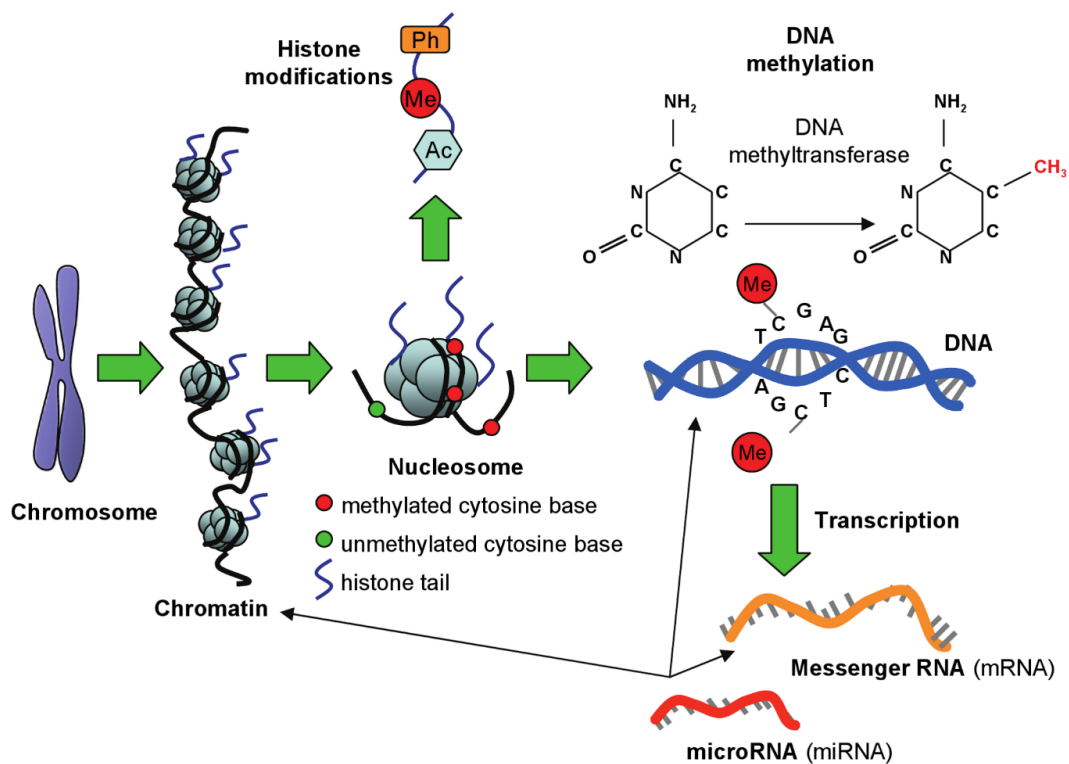


Figure 3 : **Modifications épigénétiques.** Les chromosomes sont composés de chromatine, consistant en de l'ADN enroulé autour de huit unités de protéines histone. Chaque association entre l'ADN et un octamère est appelé nucléosome. Les queues des histones qui sortent de la protéine sont modifiées en surface. Ces modifications incluent la phosphorylation (Ph), la méthylation (Me) et l'acétylation (Ac). Les molécules d'ADN sont méthylées par l'addition d'un groupe méthyl sur l'atome de carbone en cinquième position d'une base cytosine quand elle est positionnée de façon adjacente à une base guanine (sites CpG). Cette réaction est catalysée par des enzymes ADN methyltransferase. La méthylation de l'ADN permet le maintien de la répression de l'activité de gènes. La transcription implique la conversion d'ADN en ARN messager (mRNA) qui est généralement réprimée par la méthylation d'ADN et la désacétylation des histones. Le mRNA est traduit en produit protéique mais ce processus peut être réprimé par la liaison de microARNs (miRNAs) sur le mRNA. Chaque miRNA peut lier jusqu'à 200 mRNAs de différents gènes cibles. Les miRNAs peuvent aussi être impliqués dans l'établissement de méthylation d'ADN et pourrait influencer la structure chromatinienne en régulant des modulateurs d'histones (Pal & Tyler, 2010; Relton & Smith, 2010).

certaines facteurs externes au génome de la cellule comme l'induction de pathologies par d'autres organismes (Heid, 2018). De plus, certains miRNAs sont impliqués dans la communication intercellulaire et un miARN provenant d'une autre cellule de l'organisme, voire de cellules d'organismes étrangers, peut agir sur l'expression génique (Holliday, 2006; Heid, 2018). Ces caractéristiques en font un mécanisme épigénétique.

Un autre mécanisme intéressant est la méthylation d'ADN. Il a été démontré que la méthylation est impliquée dans de nombreux processus biologiques et que certaines de ces implications sont d'ordre épigénétique, indépendantes de l'expression du génome. C'est également l'information épigénétique qui sera analysée dans ce mémoire. En conséquence de ces caractéristiques, une courte section de cette introduction lui est dédiée afin d'approfondir sa description, son

utilisation et, plus globalement, pour mieux comprendre l'influence épigénétique sur l'expression génique et sur le phénotype. Ces descriptions plus générales seront, dans une certaine mesure, transposables aux marqueurs épigénétiques déjà cités.

2.1. La méthylation

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl ($-CH_3$) sur une base nucléotidique. Différentes bases nucléotidiques peuvent être méthylées ; cependant, la cytosine en est la plus sujette (Figure 3). La cytosine peut être méthylée à différents endroits mais sa forme méthylée la plus connue et étudiée est la forme 5mC (5-méthylcytosine) (Heyn & Esteller, 2015). Cette méthylation est catalysée par des enzymes faisant partie de la famille des DNMT (DNA methyltransferases) dont les DNMT3, catalysant la méthylation *de novo*, ou encore la DNMT1, catalysant la méthylation après réplication de l'ADN (Zhang & Xu, 2017). La méthylation de la cytosine en cinquième position de son cycle à six atomes, sur un atome de carbone, est observée majoritairement sur des sites dinucléotidiques appelés CpG, sites composés d'une cytosine suivie par une guanine (Klose & Bird, 2006).

Des groupements de sites CpG, appelés îlots CpG, peuvent être observés dans la séquence de différents gènes et le taux de méthylation de ces îlots peuvent influencer leur expression (Jones & Takai, 2001). En général, un taux de méthylation élevé dans un îlot CpG peut influencer l'expression d'un gène induit une répression de cette expression. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette influence comme la déstabilisation des associations entre le gène et ses facteurs de transcription. Un exemple de mécanisme pouvant expliquer cette déstabilisation peut être vu dans un changement conformationnel de la séquence d'ADN, changement empêchant physiquement la liaison d'un facteur de transcription (Figure 4 c). Elle peut également empêcher un accès physique par liaison avec d'autres facteurs, sensibles à la méthylation (Figure 4 d). Outre le fait qu'elle peut déstabiliser ces interactions, la méthylation peut être également vue comme une information en soi (Figure 4 b). Elle peut donc modifier le sens de l'information portée par une séquence d'ADN. Ce changement dans la nature de l'information portée par la séquence d'ADN peut également déstabiliser les interactions avec certains facteurs qui ne détectent ou ne reconnaissent plus leurs sites de liaison (Figure 4 c) (Schübeler, 2015). La méthylation permettrait également la condensation de l'hétérochromatine par association avec des protéines modulatrices de chromatine, limitant l'accès à certaines séquences géniques (Bender, 2004).

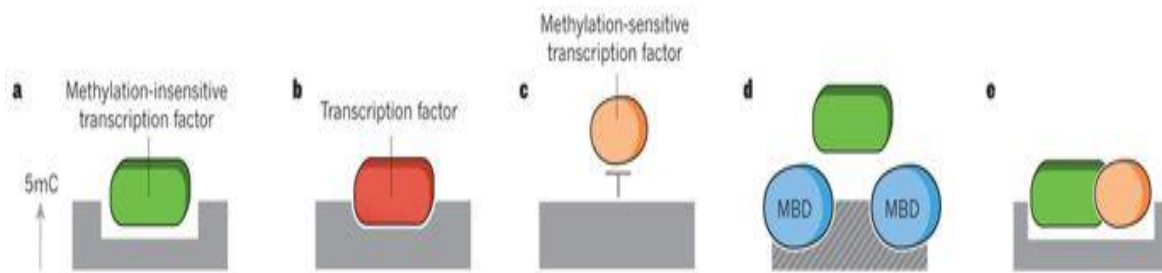


Figure 4 Scénarios potentiels pour les interactions entre méthylations de cytosines (montrées par le niveau de 5mC, en gris) et la liaison de facteurs de transcription. a : Un facteur insensible à la méthylation cause une diminution de méthylation après liaison. b : Un facteur se lie spécifiquement à une zone méthylée. c : Un facteur sensible à la méthylation est bloqué par le taux important de 5mC. d : Certaines protéines se lient à des CpG méthylés, ce qui mène à une répression indirecte du gène. e : Un facteur insensible à la méthylation sert de pionnier à l'expression du gène en créant une zone dé-méthylée, ce qui permet à des facteurs sensibles à la méthylation de se lier à cette zone (Schübeler, 2015).

L'aspect épigénétique de la méthylation de l'ADN est expliqué par l'existence de la méthylation *de novo*. En effet, ce processus n'est pas totalement dépendant de séquences nucléotidiques et peut être enclenché par divers facteurs externes comme des facteurs environnementaux. De plus, l'existence de l'enzyme DNMT1, qui reproduit les patterns de méthylation lors de la réplication de l'ADN, démontre la potentielle héritabilité de ces patterns. En d'autres termes, l'existence de méthylation *de novo* qui n'a pas été influencée directement par le génome correspond au caractère indépendant de l'épigénétique envers ce dernier. Cette méthylation peut donc être considérée comme une information ou un marqueur épigénétique. L'héritabilité de cette méthylation démontre également l'héritabilité de l'information épigénétique (Jones & Takai, 2001; Bender, 2004; Schübeler, 2015).

Pour prendre un exemple concret, la méthylation joue un rôle important dans la détermination du type polymorphique chez les abeilles. Dans une même ruche, tous les descendants possèdent un ADN presque identique. Or, certains individus femelles se spécialisent en reines ou en ouvrières. Cette spécialisation est caractérisée par un polymorphisme très marqué. Ce phénomène est causé en partie par un processus épigénétique. Lors du nourrissage des larves, les individus destinés à devenir reines sont nourris différemment des autres larves. Ces individus ont accès à de la gelée royale qui comporte des éléments à divers effets méthylants. Cette gelée va induire la répression et l'activation de certains gènes qui détermineront le type polymorphique de l'individu (Lyko *et al.*, 2010). Pour résumer, un facteur externe au génome (la gelée) induit, par le biais de méthylations, une différence d'expression génique et donc une différenciation de phénotypes.

2.2. Liens entre épigénétique et vieillissement

De par sa capacité à modifier l'expression génique, l'épigénétique influence de nombreux processus cellulaires comme le développement, la différenciation, la réponse au stress et le développement de pathologies. Le vieillissement est un de ces processus (Calvanese *et al.*, 2009). D'ailleurs, comme vu en Figure 1, les altérations épigénétiques font partie des neuf grands processus biologiques caractérisant le vieillissement (López-Otín *et al.*, 2013). Ces altérations peuvent avoir un rôle actif dans le vieillissement si on en observe spécifiquement durant le développement et le vieillissement et si elles sont corrélées fonctionnellement avec un phénotype associé à l'âge (Calvanese *et al.*, 2009). Les modifications épigénétiques au cours de l'âge peuvent expliquer, par exemple, le fait que deux individus ayant le même code génétique (ex : des jumeaux) diffèrent en de nombreux phénotypes après plusieurs années d'existence (Pal & Tyler, 2010).

Pour illustrer les liens entre vieillissement et épigénétique, un concept peut être approfondi, celui de la théorie de l'horloge épigénétique. Il a été observé qu'au cours du vieillissement les patterns de méthylation d'ADN changeaient significativement. A partir de ce constat, diverses tentative d'estimation d'âge à partir de méthylations d'ADN ont été réalisées et, dans certains cas, ont été fructueuses. Le concept d'horloge épigénétique a alors été développé : l'analyse de marqueurs épigénétiques, majoritairement la méthylation, permet l'estimation de l'âge et, en conséquence, les mécanismes épigénétiques influent très probablement sur le vieillissement (Horvath & Raj, 2018). Ils pourraient influencer beaucoup d'aspect différents du vieillissement comme son accélération (ou décélération) ou encore sa localisation sur certains tissus. Peut-être que certains mécanismes épigénétiques sont responsables de l'amorçage, du déclenchement de ce processus, ou plus simplement de son existence à part entière. Pour pouvoir répondre à ces questions, différents modèles d'études sont utilisables en laboratoire, chacun possédant différentes caractéristiques d'études intéressantes.

3. Modèles d'études du vieillissement

Pour pouvoir étudier plus en détail ces associations entre modifications épigénétiques et vieillesse, l'accès à un modèle biologique idéal est à prévoir. A l'heure actuelle, la plupart des études de vieillissement se sont focalisées sur les modèles *Drosophila sp.* ou *Caenorhabditis elegans* qui possèdent un cycle de vie court mais qui, pour de nombreux aspects, ne sont pas idéaux pour comprendre ce processus chez les vertébrés (Terzibasi *et al.*, 2007; Kumar & Rizvi, 2019). D'autres études de vieillissement se focalisent sur des modèles vertébrés comme des souris et d'autres rongeurs (Kumar & Rizvi, 2019; Li *et al.*, 2019), des zebrafish (Kishi, 2014) ou encore certaines espèces d'oiseaux (Kumar & Rizvi, 2019). Un obstacle majeur dans l'étude de ces vertébrés est leur cycle de vie long, impliquant des études sur le long terme et l'obtention de résultats sur des périodes très larges. Un meilleur modèle est à voir dans une espèce de poisson annuelle : *Nothobranchius furzeri*, le killifish turquoise. C'est le vertébré ayant l'espérance de vie la plus courte connue à ce jour (Platzer & Englert, 2016). En effet, cette espèce de vertébré possède une espérance de vie moyenne de 2 à 7 mois et subit un vieillissement très rapide (Di Cicco *et al.*, 2011; Cellerino *et al.*, 2016). Le killifish turquoise est donc un modèle de choix pour l'étude du vieillissement chez les vertébrés (Figure 5) (Hu & Brunet, 2018).

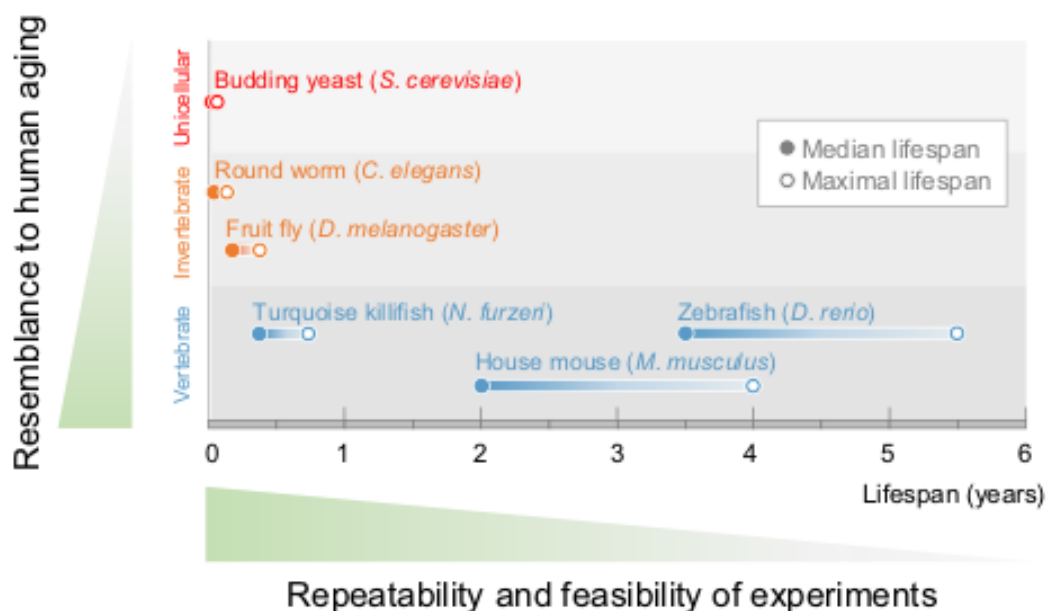


Figure 5 : Le killifish turquoise est le vertébré ayant l'espérance de vie la plus courte connue à ce jour. C'est un organisme avec une espérance de vie plus proche des organismes modèles invertébrés (levure, vers, insectes) que des organismes modèles vertébrés (souris, zebrafish). L'espérance de vie de chaque organisme est montrée avec l'écart entre la moyenne (cercles fermés) et l'espérance de vie maximale (cercles ouverts). Le killifish turquoise est dans une position unique pour des études de vieillissement chez l'homme, reprenant plus de traits de vieillissement de ce dernier que des invertébrés et possédant une espérance de vie plus courte que d'autres modèles vertébrés ce qui permet de hautes répétabilité et faisabilité en expérimentation (Hu & Brunet, 2018).

4. *Nothobranchius furzeri*

Les killifish turquoise sont des actinoptérogens téléostéens de l'ordre des cyprinodontiformes. Le genre *Nothobranchius* comporte plus de 70 espèces qui vivent toutes dans des mares temporaires situées dans le sud de l'Afrique (Afrique du Sud, Mozambique, Zimbabwe, Zanzibar, Tanzanie, Soudan) (Genade *et al.*, 2005; Cellerino *et al.*, 2016; Costa, 2018). De par le nombre important d'espèces que comporte ce genre, il est divisé en plusieurs sous-genres, comme le sous genre *Nothobranchius* dont fait partie *Nothobranchius furzeri* (Costa, 2018). Ils font partie de la famille des Nothobranchiidae, qu'ils partagent avec une dizaine d'autres genres de killifish africains, et du sous-ordre des Aplocheiloidei qu'ils partagent avec deux autres familles dont la famille Rivulidae qui comporte plusieurs espèces de killifish sud-américains (Murphy & Collier, 1996; Costa, 2018).

Deux types de souches différentes de killifish turquoise sont connus et étudiés à ce jour en laboratoire. Ces populations prennent le nom de souches GRZ et MZM ou MZC, nommées ainsi en fonction de la location du prélèvement initial des individus (GRZ pour le parc national Gona Re Zhou au Zimbabwe et MZM pour le Mozambique) (Reichard & Polačik, 2019). Il n'existe qu'une seule souche de GRZ prélevée à ce jour mais plusieurs souches de MZM ont été prélevées et diffèrent en fonction de la population naturelle dans laquelle ce prélèvement a été réalisé (ex : MZM-0403, MZM-0410) (Cellerino *et al.*, 2016). La souche GRZ vit en moyenne entre 9 et 12 semaines tandis que les souches MZM vivent en moyenne entre 21 et 28 semaines (Di Cicco *et al.*, 2011).

D'un point de vue génétique, les deux souches présentent des caractéristiques différentes en laboratoire. La souche GRZ de laboratoire présente une consanguinité très importante et un pourcentage d'hétérozygotie très faible. En effet, un seul prélèvement a été réalisé pour cette souche et tous les individus GRZ utilisés en laboratoire descendent de ce prélèvement. En conséquence, tous les individus GRZ de laboratoire descendent de reproductions entre individus de parenté rapprochée, chaque génération comportant donc des individus plus proches génétiquement, ce qui explique ce pourcentage d'homozygotie très important à l'heure actuelle. Les souches MZM, en revanche, présentent un pourcentage d'hétérozygotie beaucoup plus important, car leur prélèvement est beaucoup plus récent, mais le taux d'homozygotie commence également à augmenter, pour les mêmes raisons que pour la souche GRZ (Platzer & Englert, 2016).

Les mares dans lesquelles les killifish turquoise vivent sont séparées les unes des autres ainsi que de tous courants d'eau actifs ou de plaines alluviales, et ils peuvent cohabiter avec plusieurs espèces du genre *Nothobranchius* (comme *Nothobranchius orthonotus* ou *Nothobranchius rachovii*) au sein de la même mare. L'eau y est généralement turbide, est souvent dérangée, et reçoit de nombreuses déjections organiques de grands mammifères. Les sols de ces mares sont principalement constitués de boues et de sables (Cellerino *et al.*, 2016). La conductivité de l'eau peut varier entre 50 et 625 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ (Reichard *et al.*, 2009).

Ils sont carnivores et s'attaquent principalement à des macro-invertébrés. Leur régime semble opportuniste et dépend largement de la disponibilité en proies dans leur environnement. Il a été suggéré qu'ils préfèrent manger de petits crustacés mais d'un point de vue global leur régime peut être qualifié de généraliste. En laboratoire, plusieurs type d'alimentation leur conviennent comme des larves des genres *Chironomus* et *Chaoborus* ou encore des individus *Tubifex sp.*, *Artemia salina* et *Daphnia sp.* (Cellerino *et al.*, 2016).

Le killifish turquoise, dont la taille varie entre 3 et 15 cm de long, présente un dimorphisme et un dichromatisme sexuel très marqué (Figure 6) (Genade *et al.*, 2005; Reichard *et al.*, 2009). Les mâles sont robustes et très colorés (reflets argentés tirants sur le bleu avec une nageoire caudale portant une couleur très prononcée) tandis que les femelles sont plus petites et brunâtres. Quant aux couleurs de la nageoire caudale du mâle, elles peuvent être dans des gammes de jaune ainsi que des gammes de rouge. Ces couleurs vives seraient apparues par sélection sexuelle (Reichard *et al.*, 2009). Différentes formes chromatiques (rouges ou jaunes) peuvent être observés en fonction de la souche de killifish. La souche GRZ comporte exclusivement des formes chromatiques jaunes tandis que les souches MZM comportent soit exclusivement des formes chromatiques rouges, soit les deux formes chromatiques en fonction de leur population d'origine. Une même mare ne peut contenir deux souches différentes ; cependant, dans le cas du MZM, les deux formes chromatiques peuvent cohabiter. Aucune ségrégation génétique intrapopulationnelle n'est observée vis-à-vis de ces formes chromatiques (Cellerino *et al.*, 2016).

Les mares temporaires dans lesquelles vivent les killifish africains subsistent en moyenne 75 jours par an. En conséquence, le cycle de vie des espèces du genre *Nothobranchius* est adapté à la dessiccation annuelle de leur habitat (Figure 7) (Cellerino *et al.*, 2016). En effet, leurs œufs éclosent juste après la saison des pluies, grandissent et deviennent sexuellement matures très

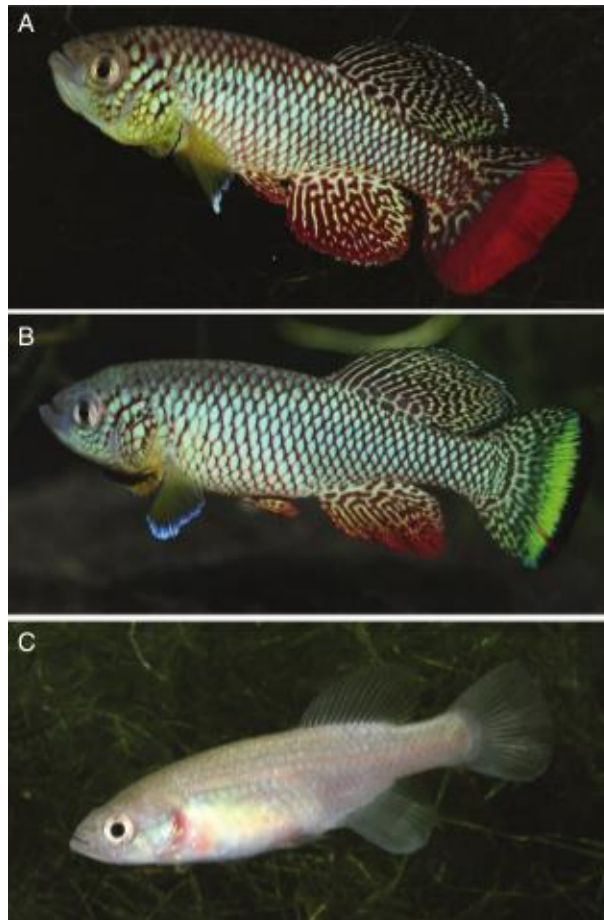


Figure 6: Mâles adultes sous forme chromatique rouge (A) et jaune (B) et femelles (C) de l'espèce *Nothobranchius furzeri* (Cellerino *et al.*, 2016)

rapidement (en quelques semaines). Après avoir atteint maturité, ils se reproduisent de façon journalière (Reichard *et al.*, 2009).

Leur type de reproduction est qualifié de polygyne et les paires reproductrices peuvent changer plusieurs fois sur une même journée. Un seul œuf est déposé sur le substrat de reproduction par événement d'oviposition. Plusieurs séquences d'oviposition sont répétées pendant la journée et les femelles peuvent pondre entre 20 et 50 œufs par jour. Les mâles sont prêts à s'accoupler en permanence et cherchent activement les femelles pour initier la ponte (Cellerino *et al.*, 2016).

Les œufs sont pondus sur un substrat particulier (formé de boues et de sables) correspondant au sol de son habitat. Une fois pondus, les œufs restent dans le substrat après assèchement de la mare et peuvent rester en diapause jusqu'au remplissage de la mare l'année d'après (jusqu'à 10 mois) (Reichard *et al.*, 2009). La diapause embryogénique consiste à l'arrêt du développement de l'embryon à un stade de développement spécifique, pour une période donnée, reportant la fin du développement à une période ultérieure (Renfree & Shaw, 2000). L'embryon peut entrer en diapause à trois moments de son développement : à la fin du stade blastula, lors de l'épibolie

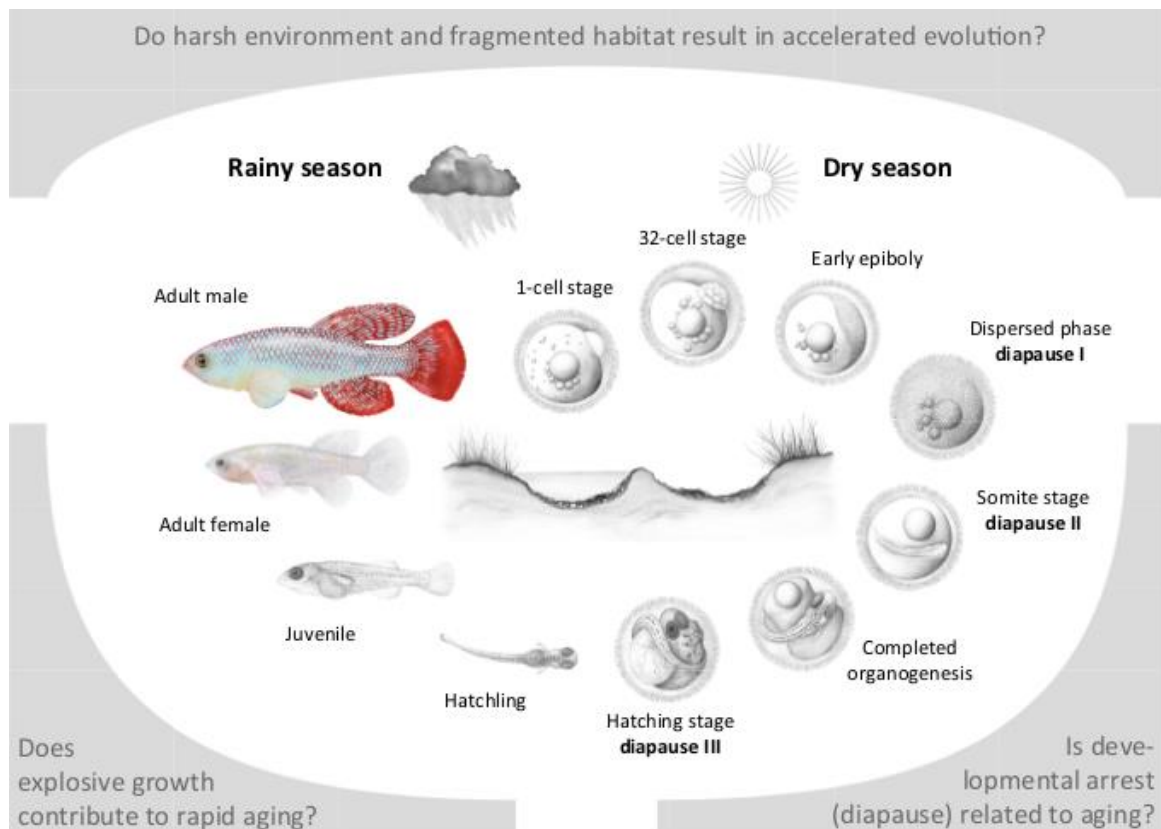


Figure 7 Au centre : avec le début de la saison des pluies, les larves de *N. furzeri* éclosent et se développent rapidement. Après quatre à cinq semaines, les juvéniles atteignent la maturité sexuelle et commencent à pondre des œufs. En fonction des conditions environnementales (comme la disponibilité en eau), une fraction des embryons complètent leur développement et éclosent durant la même saison. La plupart des embryons, cependant, vont entrer en diapause à n'importe quelle étape parmi les trois présentées ci-dessus (phase de dispersion, étape somite et étape d'éclosion). L'arrêt en diapause peut durer plus d'un an, jusqu'au commencement de la saison des pluies suivante (Platzer & Englert, 2016).

(diapause I), juste après la somatogenèse et la morphogenèse du système nerveux (diapause II) et juste avant la fin du développement embryonnaire, avant l'activation métabolique de l'organisme (diapause III) (Furness *et al.*, 2015; Cellerino *et al.*, 2016). Chez *N. furzeri*, les trois diapauses peuvent ne pas se prolonger si les conditions environnementales sont propices au développement. La diapause I dure en moyenne 5 jours mais peut être prolongée sous de mauvaises conditions. La diapause II peut durer entre 2 jours et 3 ans. La diapause III peut durer aussi longtemps que la diapause II. Sous ces deux dernières formes, *N. furzeri* peut rester dans le sol asséché de sa mare jusqu'à la prochaine saison des pluies (Furness *et al.*, 2015; Cellerino *et al.*, 2016).

Lors du remplissage de la mare, un assemblage complexe de divers facteurs environnementaux peuvent stimuler l'embryon en diapause et déclencher la fin du développement embryogénique ainsi que l'éclosion. Ce phénomène n'est pas encore totalement élucidé ; il a été mis en évidence que la pluie, la température, la luminosité, la photopériode ou encore la présence

d'adultes dans la marre peuvent influencer l'éclosion, mais cette influence sera différente en fonction du stade de diapause. Parfois, même quand toutes les conditions environnementales sont réunies, l'éclosion ne se produit pas (Furness *et al.*, 2015). Néanmoins, quand elle se produit, les individus se développent et atteignent la maturité sexuelle très rapidement, typiquement entre 3 et 4 semaines (Cellerino *et al.*, 2016).

5. Objectif de ce mémoire

L'objectif général de ce mémoire consiste en la caractérisation de marqueurs épigénétiques et de phénotypes associés au vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*.

Les poissons maintenus en captivité seront étudiés à différents moments clef de leur développement : Juvéniles, jeunes adultes, adultes, et vieux poissons.

5.1. Objectifs spécifiques

5.1.1. Etablissement d'un référentiel épigénétique

La méthylation de gènes spécifiques sera analysée à différents stades de vie et dans différents organes de *Nothobranchius furzeri* afin de catégoriser leurs états de méthylation en fonction du vieillissement. Ces gènes spécifiques seront choisis en fonction de leurs liens avec le vieillissement et avec les phénotypes caractérisés dans le référentiel phénotypique.

5.1.2. Etablissement d'un référentiel phénotypique

Premièrement, un référentiel comportemental sera réalisé en fonction de différents stades de vie de *Nothobranchius furzeri*. Des tests comportementaux seront réalisés sur des spécimens juvéniles, adultes et vieux afin d'établir des différences dans certains paramètres comportementaux en fonction de l'âge. Enfin, des caractères morphologiques seront pris à chaque stade de vie.

Matériel et méthode

1. Elevage et maintien de la lignée de killifish

Pour la réalisation de ce mémoire, une lignée GRZ de killifish turquoise a été utilisée. Le stock fondateur de l'élevage provient d'individus fournis en 2018 par l'équipe du laboratoire du Dr Dario Valenziano du Max Plank Institute. Depuis, la lignée est maintenue et reproduite au sein du laboratoire.

1.1. Système d'élevage

Les killifish turquoise sont élevés dans un système fermé type « stand-alone ». Ce système est composé d'un ensemble d'aquariums individuels rectangulaires (30x20x15cm) à renouvellement d'eau continu. Les eaux usées de tous les aquariums sont collectées dans un tuyau unique, débouchant dans une grande cuve composée d'un système de chauffage et de filtres physiques et biologiques permettant le recyclage préliminaire de l'eau. L'eau est ensuite pompée au travers un filtre UV avant d'être distribuée dans les différents bassins. Les paramètres physico-chimiques de l'eau sont maintenus constants à 600µs et 27°C. Pour ce faire, l'eau des aquariums est composée d'eau reconstituée par 18g de sel (InstantOcean) dans 60L d'eau distillée (RO water Type II). Une fois par semaine, 25% de l'eau du système est renouvelé, le fond des bacs est siphonné de ses détritiques et de l'eau reconstituée est ajoutée au bac réservoir. Régulièrement, un apport d'eau distillée est ajouté au système afin de contrebalancer la perte d'eau due à l'évaporation (Figure 8).

Tous les individus sont nourris *ad libitum* d'*Artemia salina* vivants deux fois par jour (matin et après-midi). Les *Artémia* évoluent dans de l'eau salée, en élevage dans nos laboratoires. Ils sont donc rincés à l'eau douce du système avant d'être distribués aux killifish. Un entretien régulier de cet élevage d'*Artémia* est également assuré.

1.2. Maintien de la lignée

Les poissons destinés à la reproduction sont disposés en harem, un mâle pour trois femelles, dès maturité sexuelle. Un substrat de ponte composé de sable tamisé à 500 microns est disposé dans le fond de l'aquarium. Deux à trois fois par semaine, le bac est tamisé à 500µm et les œufs pondus sont récupérés.

Les œufs sont nettoyés et désinfectés par un passage sous agitation dans des solutions de peroxyde d'oxygène (1%) et de bleu de méthylène (1%) (Figure 9).

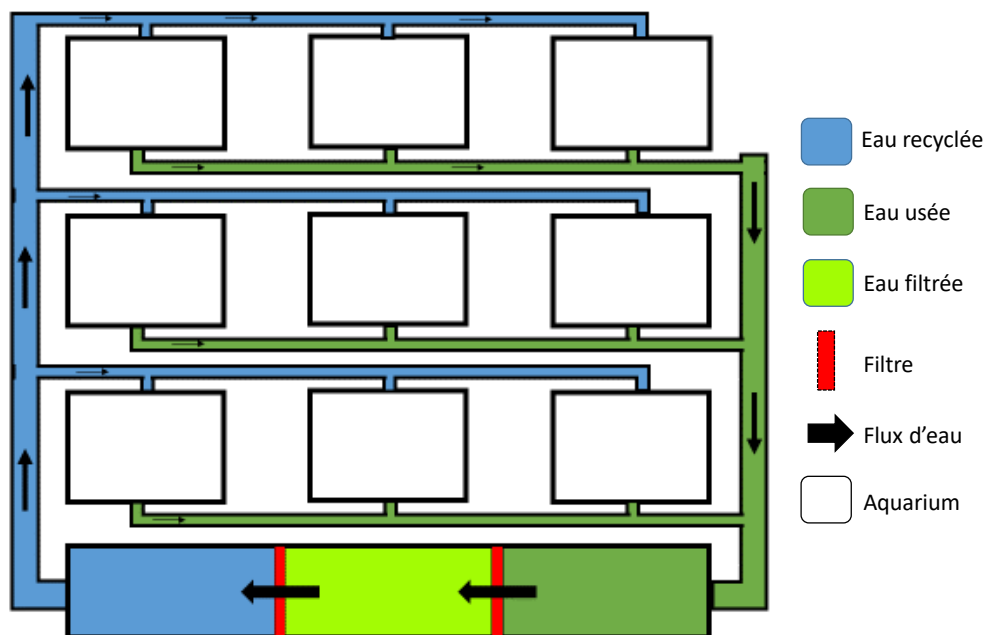


Figure 8 Représentation schématique du système fermé d'aquarium.

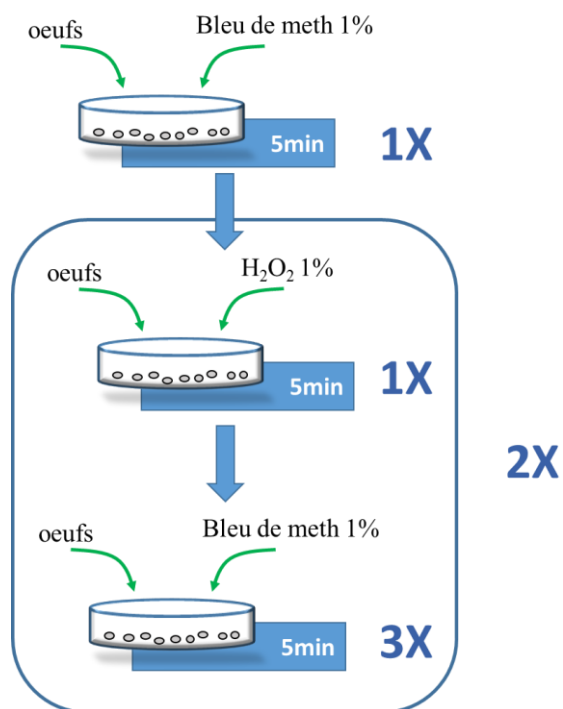


Figure 9 Protocole de nettoyage des œufs

Ils sont ensuite triés sous binoculaire et les œufs non fécondés ou morts sont écartés des œufs fécondés. Les œufs fécondés présentent une double membrane bien distincte, ont un aspect transparent et présentent de nombreuses gouttelettes lipidiques. Les œufs morts sont généralement de couleur blanche, opaque, ne permettant pas de distinguer les composants intérieurs. Finalement, les œufs non fécondés sont transparents et possèdent des gouttelettes lipidiques, mais ne présentent pas de double membrane (Figure 10).

Après le nettoyage et le tri, les œufs fécondés sont disposés sur un substrat humide constitué de fibre de noix de coco disposée dans une boîte de pétri scellée par des bandes de parafilm. Cette boîte de pétri est ensuite mise sous incubateur à 27 °C. Cette manipulation permet d'obtenir une condition optimale au développement des œufs qui s'achève précisément au bout de trois semaines. Après ce développement, les œufs sont conservés à 17 °C afin d'être maintenus dans un état de diapause en l'attente de l'éclosion. Cette conservation permet de stocker les œufs pendant plusieurs mois et de déclencher une éclosion simultanée des œufs récoltés tous le long de la vie des individus reproducteurs.

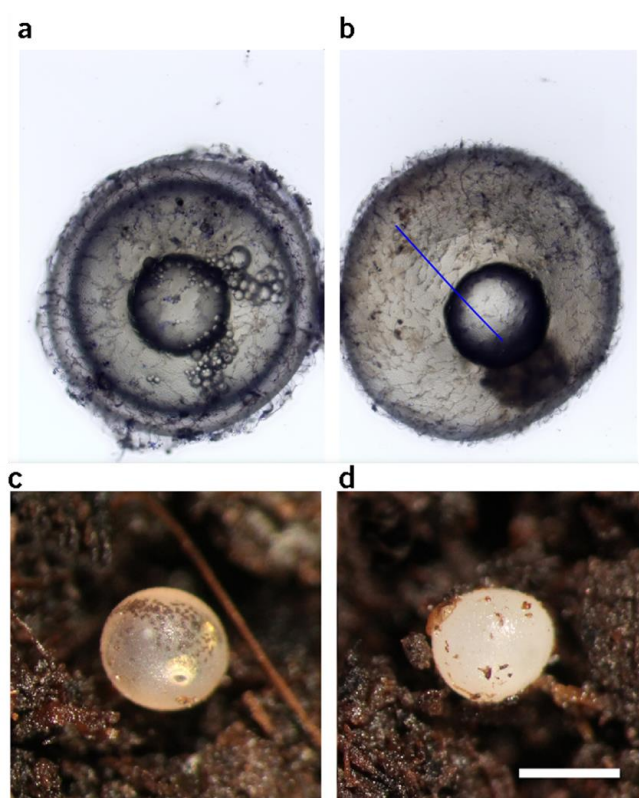


Figure 10 Différences entre les différents états des œufs de *Nothobranchius furzeri*. a) Œuf fécondé ; b) Œuf non-fécondé ; c) Œuf en développement ; d) Œuf mort. La barre d'échelle bleue représente 0.5 mm pour les figures a et b et la barre blanche représente 1 mm pour les figures c et d. Cette figure est un arrangement des figures présentées dans l'article de Polacik et al. de 2016 (Polačik et al., 2016).

Pour déclencher l'éclosion, un minimum d'une cinquantaine d'œufs sont transférés dans 1 cm d'eau mélangée à de l'acide humique à concentration de 0.33 g/L. L'eau est préalablement réfrigérée à 4 °C, le choc thermique favorisant l'éclosion. Le bassin est ensuite placé sous incubateur et bulleur d'oxygène. Toutes les 24 h 00 pendant cinq jours, la concentration en acide humique est diluée par deux fois afin d'obtenir une eau semblable à celle du système d'aquarium. Après une semaine, les poissons sont transférés par 10 individus dans des bassins à capacité de 6 litres remplis d'eau du système. Après une autre semaine de développement, les individus sont séparés et disposés dans des aquariums individuels jusqu'à maturité sexuelle où les harems sont créés et les individus restants sont laissés seuls. Ce sont ces derniers individus qui seront étudiés dans ce mémoire.

2. Caractérisation phénotypique de *Nothobranchius fuzeri*

Pour cette étude, 15 individus mâles *Nothobranchius fuzeri* seront caractérisés à l'âge de 5, 9, 12, 16 et 21 semaines post éclosion (wph). Lors de ces différents time-points les caractéristiques comportementales et morphologiques seront étudiées.

Tous les tests ont été réalisés suivant le schéma présenté en Figure 11. Ce design expérimental permet le dupliqua de chaque test comportemental sur la même semaine tout en laissant un jour de repos entre les répliques afin d'éviter un éventuel biais comportemental lié au stress des manipulations. L'ordre des tests est volontairement déterminé pour passer des manipulations les moins stressantes au plus stressantes.

2.1. Analyse comportementale

Pour l'étude comportementale, deux tests ont été réalisés. Le premier d'entre eux est un test "d'Open field" permettant d'analyser le comportement habituel de l'individu dans son bassin individuel. Le deuxième est un "Shelter test" permettant d'évaluer le niveau d'audace de l'individu.

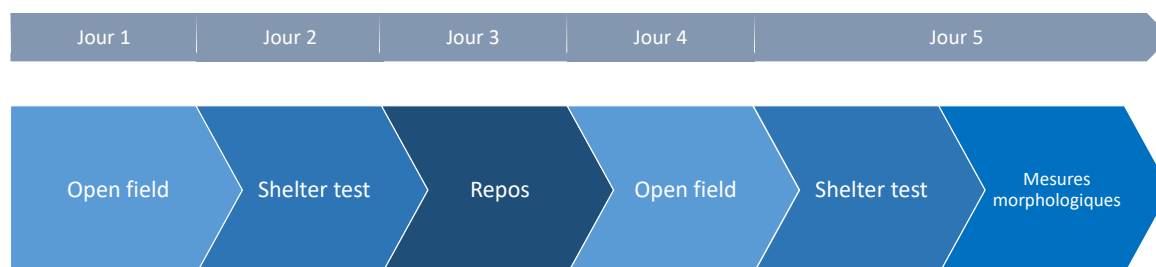


Figure 11 Design expérimental

Pour les deux tests réalisés, les individus sont restés à jeun pendant la journée de test afin d'éviter un potentiel biais comportemental lié à une assimilation différentielle d'énergie (Filosa *et al.*, 2016). Ils sont en revanche nourris dès la fin du test. Lors de leur jour de repos (Figure 11), ils sont nourris comme d'ordinaire : *ad libitum*, matin et après-midi. Les tests ont été enregistrés par caméra (SONY HDR-CX625) placées au-dessus des arènes de test. Pour tous les tests, les paramètres physico chimique de l'eau sont mesurés.

2.1.1. Test d'openfield

L'arène de test est le bassin individuel dans lequel l'individu vit Figure 12. Ce bassin est rectangulaire, de longueur de 30 cm, de largeur de 20 cm et de profondeur de 15 cm. En plus du comportement habituel du poisson, une composante de thigmotaxie est analysée dans ce test. La thigmotaxie est la tendance du poisson à rester sur les bords physiques de son environnement. Afin d'analyser cette composante, une zone centrale, virtuelle, de 10 cm sur 10 cm a été créée à l'intérieur du bassin, comme vu sur la Figure 13. Les dimensions de cette zone ont été calculées en considérant que la superficie de la zone centrale, déterminée comme zone « à risque » pour le poisson, représente un quart de la superficie de l'arène matérielle, superficie que le poisson peut toucher (Thoré *et al.*, 2018). Sur les Figure 12 et Figure 13, on observe que le tuyau d'évacuation du bassin est disposé près d'un des bords de l'arène. Pour cette étude, nous avons considéré ce tuyau comme faisant partie intégrante de la limite extérieure de l'arène matérielle. Etant donné que le tuyau est une composante matérielle que le poisson peut toucher et que l'espace entre le tuyau et la paroi de l'aquarium est faible, cet espace est considéré comme zone de confort. La superficie de la zone centrale a donc été calculée à partir de la superficie matérielle de l'arène, tuyau compris (Figure 13).

Avant de placer le bassin sous caméra, son niveau d'eau a été baissé jusqu'à 3 cm afin d'éviter un déplacement vertical du poisson, déplacement qui ne serait pas possible à analyser par vidéo. Enfin, tous les bords transparents du bassin ont été rendus opaques afin d'éviter un biais comportemental dû à un stimulus extérieur.

25 minutes de vidéo ont ensuite été enregistrées. Ces 25 minutes comprennent cinq minutes d'acclimatation et 20 minutes de test.

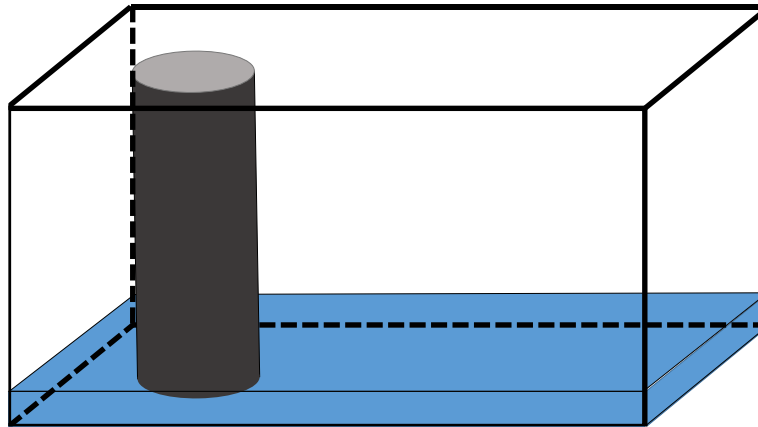


Figure 12 Représentation schématique de l'arène d'openfield. La zone bleue représente la quantité d'eau contenue lors du test. Le cylindre représente le tuyau d'évacuation d'eau usée de l'aquarium.

Après test, le bassin est remis en place dans le système d'aquariums et le niveau d'eau initial est rétabli.

2.1.2. Shelter test

L'arène de ce test est conçue en deux parties majeures, l'arène proprement dite, opaque et circulaire et un abri, tuyau opaque, adjacent à l'arène. Pour chaque test, deux litres d'eau reconstituée sont versés dans l'arène déjà disposée sous caméra. La conjonction entre l'abri et l'arène dispose d'un clapet amovible permettant le déplacement, ou non, du poisson entre ces deux parties (Figure 14).

Le poisson est transféré dans l'abri, clapet fermé, à l'aide d'une épuisette. L'abri est obstrué des deux côtés, laissant le poisson dans le noir pendant 15 minutes d'acclimatation. Après ces

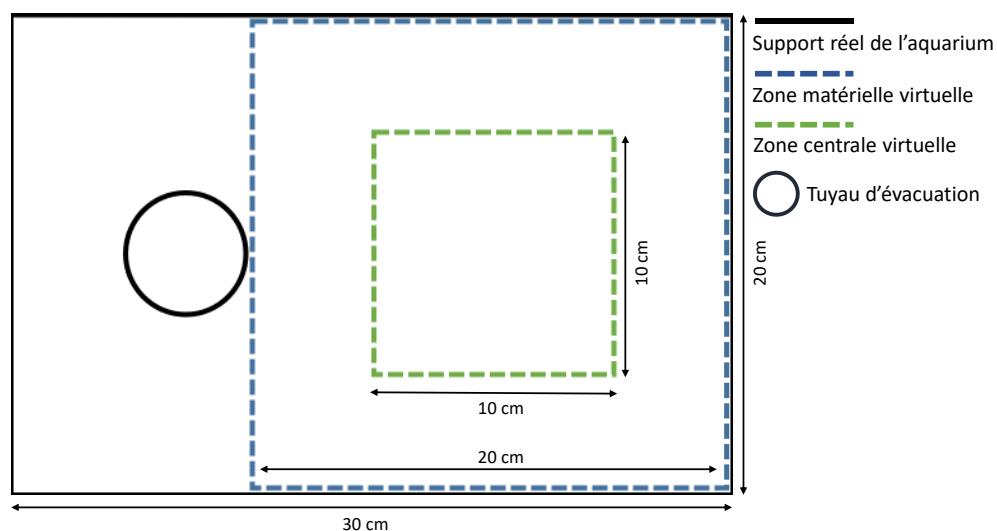


Figure 13 Représentation schématique de l'arène d'Openfield, vue du dessus.

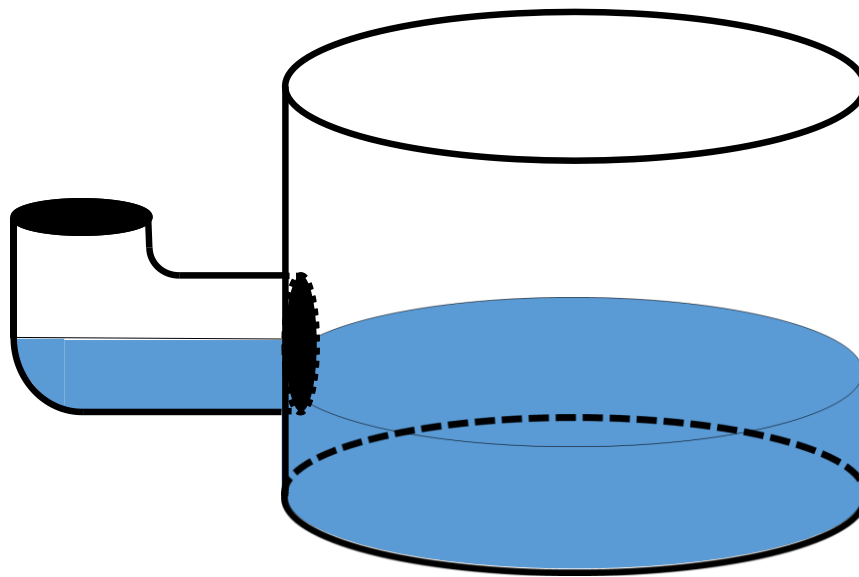


Figure 14 Représentation schématique de l'arène du shelter test, avec abri obstrué. Les zones bleues représentent les deux litres d'eau contenus dans l'arène lors du test. L'obstruction noire aux bords pointillés représente le clapet amovible entre l'arène et l'abri.

15 minutes, l'enregistrement vidéo est enclenché et le clapet est ouvert par l'expérimentateur afin de permettre l'accès à l'arène pour une durée totale de 25 minutes.

Après ces 25 minutes, le poisson est disposé dans un bassin individuel, externe au système d'aquarium, pour éviter une diffusion potentielle de stressants biologiques dans les bassins des poissons qui n'ont pas encore été testés. Après la réalisation des tests sur tous les individus, ces derniers sont remis dans leurs bassins respectifs.

2.1.3. Analyse des vidéos

Toutes les vidéos ont été analysées à l'aide du programme *Ethovision XT13* (version 13.0.1220, Noldus). Le programme a permis d'obtenir l'ensemble des différentes variables comportementales analysées dans ce mémoire. Seule la fréquence de rentrée et sortie de l'arène dans le cadre du *Shelter test* a été établie par comptage manuel.

2.2. Prise des mesures morphologiques

Pour l'analyse morphologique, deux manipulations distinctes ont été réalisées. La première est une pesée et la deuxième une photographie de l'individu, permettant d'obtenir respectivement le poids et la taille de ce dernier.

Ces mesures sont réalisées après tous les tests comportementaux afin d'éviter une influence du stress causé par la manipulation.

2.2.1. Pesée

Un bassin d'eau est disposé sur une balance à précision de l'ordre du centigramme (Sartorius BP2100S). La balance est tarée puis le poisson est délicatement transféré dans le bassin en étant au préalable délicatement et rapidement essuyé sur un gant en latex afin d'éviter de peser un surplus d'eau.

2.2.2. Mesure de la taille

L'individu est placé dans une petite boîte de pétri en verre remplie d'un peu d'eau, permettant la respiration. Cette étape permet d'éviter un déplacement du poisson assez longtemps que pour prendre une photographie nette. La photographie est ensuite prise avec un appareil du type Pentax MX-1. En arrière-plan de chaque photo est tracée une échelle centimétrique permettant de calibrer toutes les photos séparément (Figure 15).

Toutes les photographies ont été analysées à l'aide du programme *Imagej* (Rasband, 2018) afin de mesurer la taille du poisson.



Figure 15 Photographie de l'individu numéro 13 à l'âge de 16 semaines. Cette photographie permet la mesure de la taille de l'individu.

3. Caractérisation épigénétique de *Nothobranchius furzeri*

Pour cette partie, la méthylation de six séquences géniques du cerveau et du foie de dix individus mâles a été analysée par pyroséquençage. Sur les dix individus analysés, cinq sont âgés de 5 wph et cinq sont âgés de 9 wph.

3.1. Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêt

Afin de cibler certaines zones riches en CpG dans les séquences de six gènes d'intérêt, une cartographie des îlots CpG de ces gènes a été réalisée à l'aide d'outils bio-informatiques.

Les séquences génomiques de *Nothobranchius furzeri* analysées ont été récupérées sur le *Genome Browser* du killifish turquoise créé par le Leibniz Institute on Aging-Fritz Lipmann Institute (Reichwald *et al.*, 2015). Ce programme en ligne permet l'accès aux séquences annotées du dernier assemblage en date du génome de *Nothobranchius furzeri*.

Les îlots CpG ont été détectés à l'aide du programme *Methprimer* du site en ligne *Urogene.org* (Li & Dahiya, 2002). Le programme a été configuré pour détecter des zones possédant les caractéristiques propres aux îlots CpG : une longueur de séquence de plus de 200 paires de bases, un pourcentage de bases C et G de plus de 50 % et un ratio de CpGs observés/attendus de plus de 60% (Yang *et al.*, 2016).

3.2. Extraction du matériel biologique

Le cerveau est récupéré en moins de deux minutes et le foie en moins de cinq minutes par dissection. Pour conserver un maximum les différents tissus biologiques prélevés, la dissection est réalisée sur glace et, dès prélèvement, les différents organes sont plongés dans de l'azote liquide puis conservés à -80 °C.

L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit d'extraction NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany). La manipulation s'est réalisée selon le protocole d'extraction spécifique aux tissus animaux fourni avec le kit. Après extraction, l'ADN est conservé à -20°C.

3.3. Pyroséquençage

Le traitement bisulfite nécessaire à l'analyse de méthylation de l'ADN extrait a été réalisé avec le kit de conversion *Zymo EZ-DNA Methyl-Gold* (Zymo Research, Irvine, CA). La manipulation s'est réalisée selon le protocole fourni avec le kit.

Les amorces nécessaires au pyroséquençage ont été conçues à l'aide du programme *PyroMark Assay Design Software 2.0.2* (Quiagen). Leurs séquences sont disponibles en Annexe 1.

Pour amplifier les séquences d'intérêts ayant subi le traitement bisulfite avec les amorces conçues, une PCR a été réalisée avec le kit *PyroMark PCR* (Quiagen). La manipulation s'est réalisée selon le protocole fourni avec le kit. Le mix PCR a été réalisé à partir des réactifs du kit et contient, par réaction, 12.5 µl de *PyroMark PCR Master Mix*, 2.5 µl de *CoralLoad*, 1 µl de solution de Magnésium, 6 µl d'eau RNase free, 2 µl de primers à concentration 0.1 µM et 1 µl d'ADN traité au bisulfite.

L'efficacité de l'amplification PCR a été visualisée par migration de 1 µl de produit d'amplification sur gel d'Agarose 2%. Le produit est ensuite conservé à -20°C.

Le pyroséquençage a été réalisé sur 12 µl de produit PCR à l'aide du pyroséquenceur *Pyromark Quiagen Q 24* (Quiagen). Les réactifs utilisés pour le traitement préparatoire au séquençage proviennent du kit *PyroMark Q24 Advanced Reagents* (Quiagen). L'ensemble de la manipulation a été réalisée suivant le protocole de ce kit. Le design du séquençage et des quantités de réactifs nécessaires à sa réalisation a été réalisé à l'aide du programme *Pyromark Q24 Advanced* (Quiagen). Les réactifs nécessaires au séquençage proviennent également du kit *PyroMark Q24 Advanced Reagents* (Quiagen). Les séquences complètes analysées par pyroséquençage sont disponibles en Annexe 2.

4. Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme R (R Core Team, 2014).

4.1. Analyse des variables comportementales

Toutes les variables ont été analysées par modèles linéaires mixtes à l'aide des fonctions *lmer* et *glmer* du package *lme4* (Douglas *et al.*, 2015). La fonction *glmer*, travaillant en transformations *log*, a été utilisée pour les variables de fréquences.

Ces modèles expliquent l'évolution d'une variable en fonction d'un gradient empirique ou factoriel. De ce fait, plusieurs facteurs peuvent être intégrés dans le modèle pour expliquer au mieux l'évolution de la variable étudiée. Ces facteurs, ou effets, sont de deux types : les facteurs fixes et les facteurs aléatoires.

Les facteurs fixes expliquent l'évolution de la variable étudiée en fonction du gradient d'intérêt. Dans cette étude, deux facteurs fixes d'importance ont été étudiés : l'âge et le réplica (entre les

deux tests réalisés par tranche d'âge). Les paramètres physicochimiques (conductivité et température de l'eau au moment du test), la taille, le poids, et l'âge de mort de l'individu peuvent être ajoutés au modèle comme effets fixes concomitants à l'âge et au réplica.

Pour cette analyse, l'identité du poisson a été modélisée comme effet aléatoire. Ce statut permet de spécifier au modèle que les données sont dépendantes entre elles, que toutes les données associées au matricule d'un poisson ont toutes été réalisées sur le même individu.

Afin de déterminer l'association de facteurs fixes idéale pour expliquer la variable étudiée, une comparaison entre modèles représentant l'ensemble des associations possibles entre ces effets a été réalisée. Cette comparaison se base sur le calcul de la vraisemblance de chaque modèle à expliquer l'évolution de la variable d'intérêt. Elle a été réalisée par la fonction *anova* du programme R. Au fil des comparaisons entre modèles, celui permettant une meilleure explication de la variable étudiée est retenu et analysé.

La significativité des effets fixes sur l'évolution de la variable a été vérifiée. En d'autres mots, il a été vérifié que sans cet effet fixe, l'évolution de la variable n'est pas ou est moins bien expliquée. Pour ce faire, la fonction *Anova* du package *car* (Fox & Sanford, 2019) a été utilisée afin de réaliser un test chi carré de Wald entre les différences de variances des prédictions du modèle, engendrées par l'ajout ou la disparition d'un effet fixe.

Avec l'effet aléatoire, la répétabilité du test entre individus a pu être calculée. La répétabilité calculée dans un modèle linéaire mixte est définie par $V_{int}/(V_{int}+V_{res})$ avec V_{int} = variabilité intra-individuelle (entre les mesures prises sur les mêmes individus) et V_{res} = variabilité résiduelle, variabilité non expliquée par les effets fixes et par l'effet aléatoire. Les différentes variances du modèle sont récupérées à l'aide de la fonction *summary* du programme R. La significativité de la représentativité de la répétabilité a été supposée en comparant les modèles avec et sans effets aléatoires.

Lorsque la significativité de l'effet fixe est mise en évidence pour l'âge ou pour le réplica, un contraste entre les moyennes prédites par le modèle est réalisé. Les moyennes pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines et les moyennes pour les réplicas A et B sont comparées afin de déterminer si elles sont significativement différentes entre elles. Ce contraste est réalisé à l'aide de la fonction *emmeans* du package *emmeans* (Lenth, 2019) et est ajusté par la méthode de Tukey.

Les hypothèses des modèles ont été vérifiées graphiquement et statistiquement pour la normalité de la distribution des résidus (test de Shapiro-Wilk). Afin d'assurer ces hypothèses, certaines variables ont dû être transformées. L'ensemble des structures des effets fixes et des transformations réalisées sur les variables est disponible en Annexe 3.

4.2. Analyse des variables morphologiques

La taille et le poids ont également été modélisés par la fonction *lmer*. Pour ces variables, le seul effet fixe étudié est l'âge du poisson et l'individualité est encore disposée en effet aléatoire.

Après création du modèle, les mêmes analyses qu'avec les variables comportementales ont été réalisées. Aucune transformation n'a été nécessaire.

4.3. Analyse des pourcentages de méthylation

Les médianes des pourcentages de méthylation par conditions (Ages et Organes) ont été analysées avec un test de Kruskal-Wallis via la fonction *kruskal.test* du programme R.

Si une différence significative est mise en évidence entre ces médianes, un contraste de Dunn est réalisé pour déterminer quelles conditions sont différentes entre elles. Le test est réalisé avec la fonction *dunn.test* du package *dunn.test* (Alexis, 2017).

Résultats

1. Mortalité

Une courbe de survie de Kaplan-Meier a été réalisée (Figure 16). Durant l'expérience, la survie moyenne de la population est de 144 jours post éclosion (dph). Le premier individu est mort à 70 dph, le dernier à 176 dph.

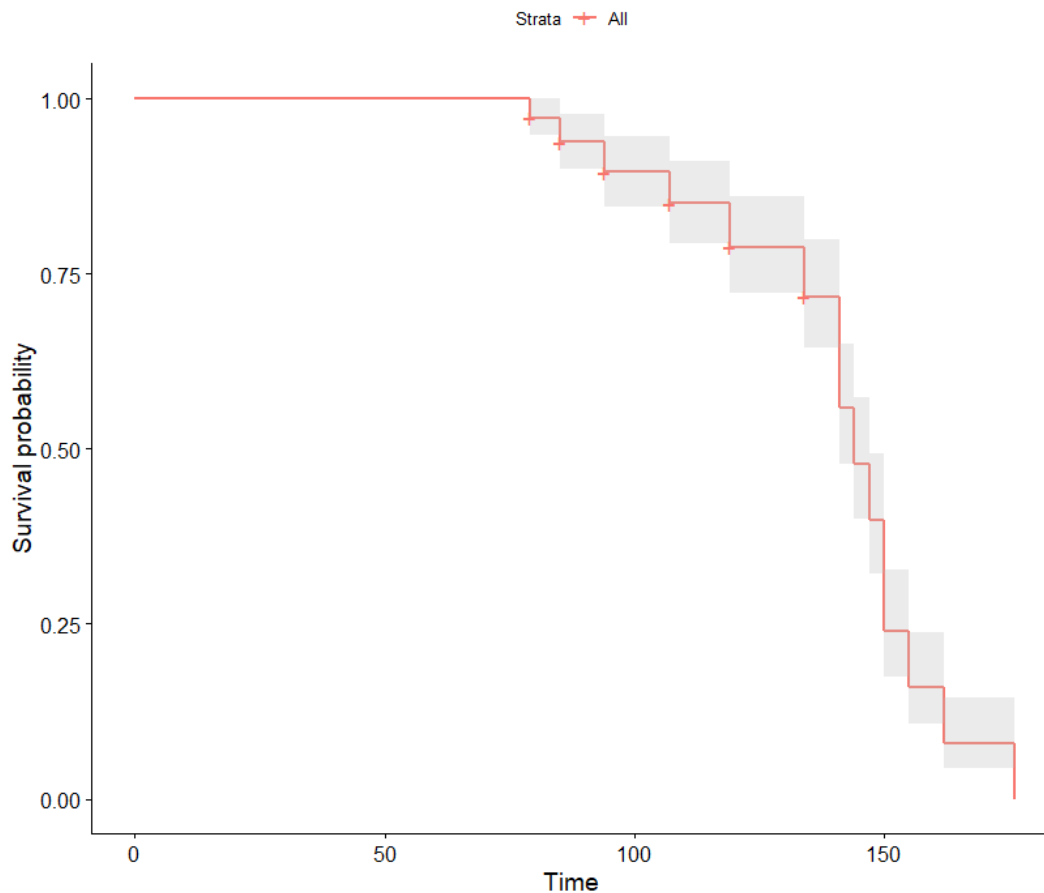


Figure 16 Courbe de Kaplan-Meier représentant la probabilité de survie des individus étudiés en tests comportementaux. Le temps est représenté sous forme de jours de vie.

2. Variables morphologiques

Pour la taille des individus, un modèle linéaire expliqué par l'âge a été réalisé. L'effet de l'âge sur l'évolution de la taille est significatif ($p < 2.2e-16$). Après réalisation de contrastes, il semblerait que toutes les moyennes prédites soient différentes entre elles, excepté pour les contrastes entre 12-16 et 16-19 semaines. Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 43.3, 51.4, 55.0, 55.5 et 56.6 mm. La répétabilité de la variable est de 69.9 % ce qui suggère une homogénéité importante de l'évolution de la taille entre individus. Les prédictions de cette variable sont disponibles en Figure 17.

Pour le poids des individus, un modèle linéaire expliqué par l'âge a été réalisé. L'effet de l'âge sur l'évolution du poids est significatif ($p < 2.2e-16$). Après réalisation de contrastes, il semblerait que toutes les moyennes prédites soient différentes entre elles, excepté pour le contraste entre 12 et 16 semaines. Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 0.94, 1.59, 1.71, 1.73 et 1.92 grammes. La répétabilité de la variable est de 63.7 % ce qui démontre une homogénéité importante de l'évolution de la taille entre individus. Les prédictions de cette variable sont disponibles en Figure 18.

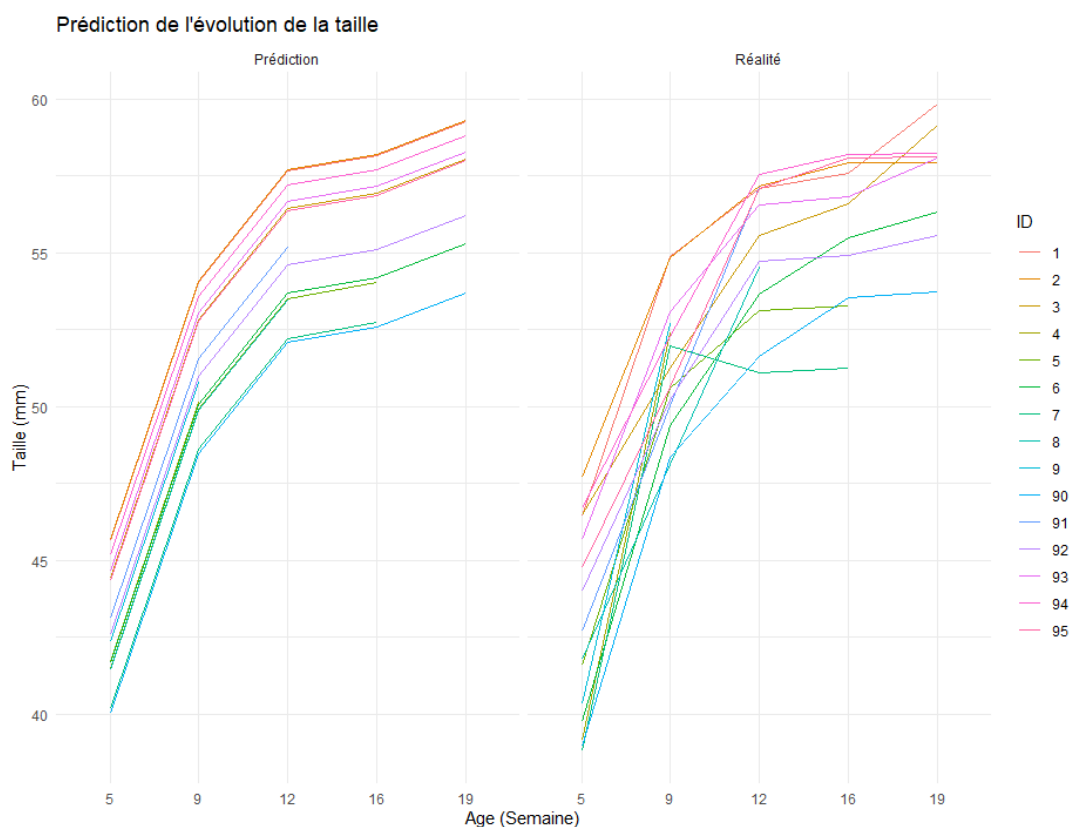


Figure 17 Prédiction, par individus, de la taille en fonction de l'âge du poisson.

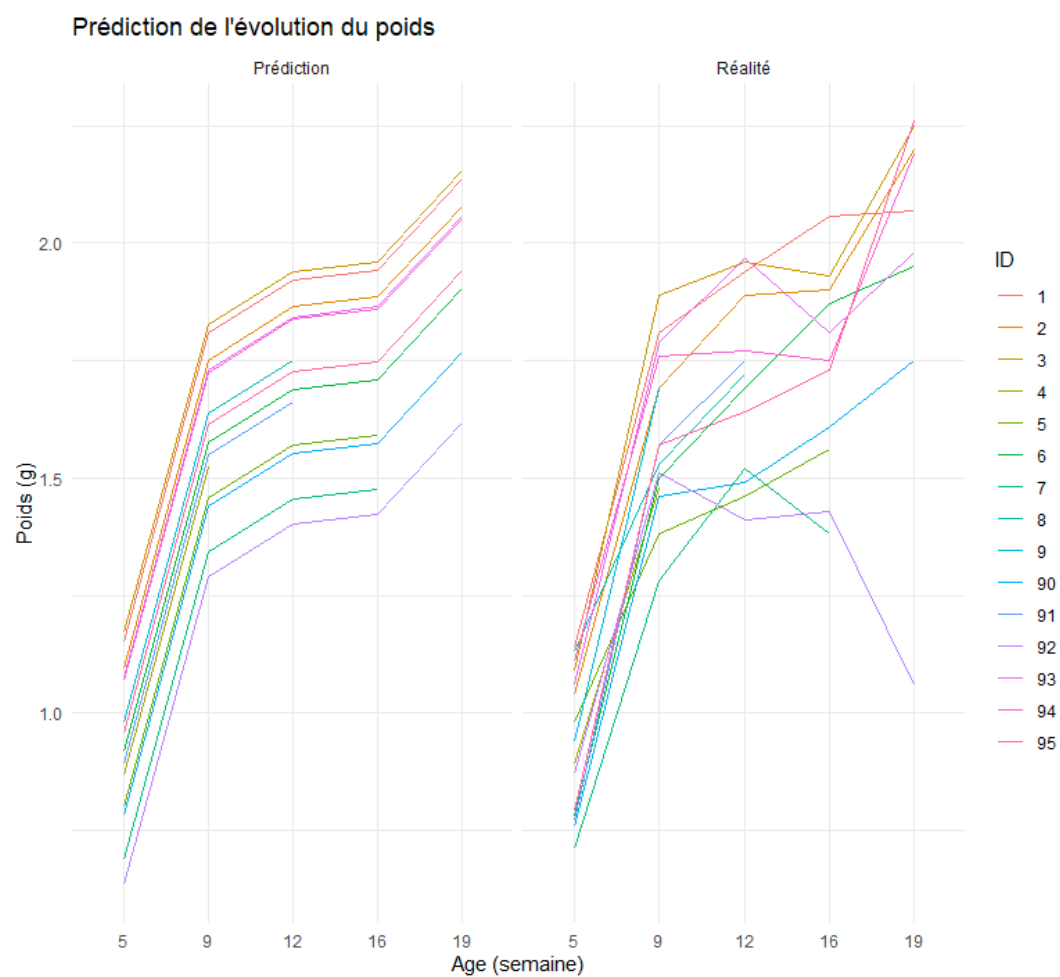


Figure 18 Evolution, par individus, du poids en fonction de l'âge du poisson.

3. Variables comportementales

Les variables étudiées dans cette section sont subdivisées en deux catégories distinctes. La première reprend l'évolution de plusieurs variables empiriques communes aux deux tests (Open-field et Shelter test). La seconde reprend l'évolution de variables spécifiques à chaque test.

3.1. Variables communes aux deux tests

Vitesse moyenne (cm/s) : cette variable représente la distance totale parcourue par le poisson par rapport à la durée totale du test.

En Open field, la vitesse moyenne a été modélisée avec l'âge, le réplica et la température comme effets fixes. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p=2.246e-06$, Réplica : $p=4.142e-07$, Température : $p=0.0008179$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 1.93, 2.2, 4.47, 5.65 et 5.18 cm/s. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne à 5 semaines est significativement plus petite que les moyennes à 12, 16 et 19 semaine et que la moyenne à 9 semaines est significativement plus petite que les moyennes à 16 et 19 semaines. Une augmentation significative de la vitesse est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 3.36 et 4.41 cm/s. La répétabilité du test est significative et est de 37.6 %. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 19 et Figure 20.

En shelter test, la vitesse moyenne, un modèle impliquant l'âge et la température a été réalisé. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p= 0.01723$, Température : $p= 0.01362$). L'évolution des moyennes prédites en fonction de l'âge simulent une évolution en cloche avec un minima à 5 semaines, à un pic à la semaine 12 et un nouveau minima à la semaine 19. Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 1.08, 1.44, 1.53, 1.34 et 1.09 cm/s. Après analyse par contrastes, aucune moyenne n'a pu être différenciée des autres. La répétabilité du test n'a pas pu être évaluée car l'effet individuel sur la divergence de la réponse au test est considéré comme non significatif. Aucunes différences entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 21 et Figure 22.

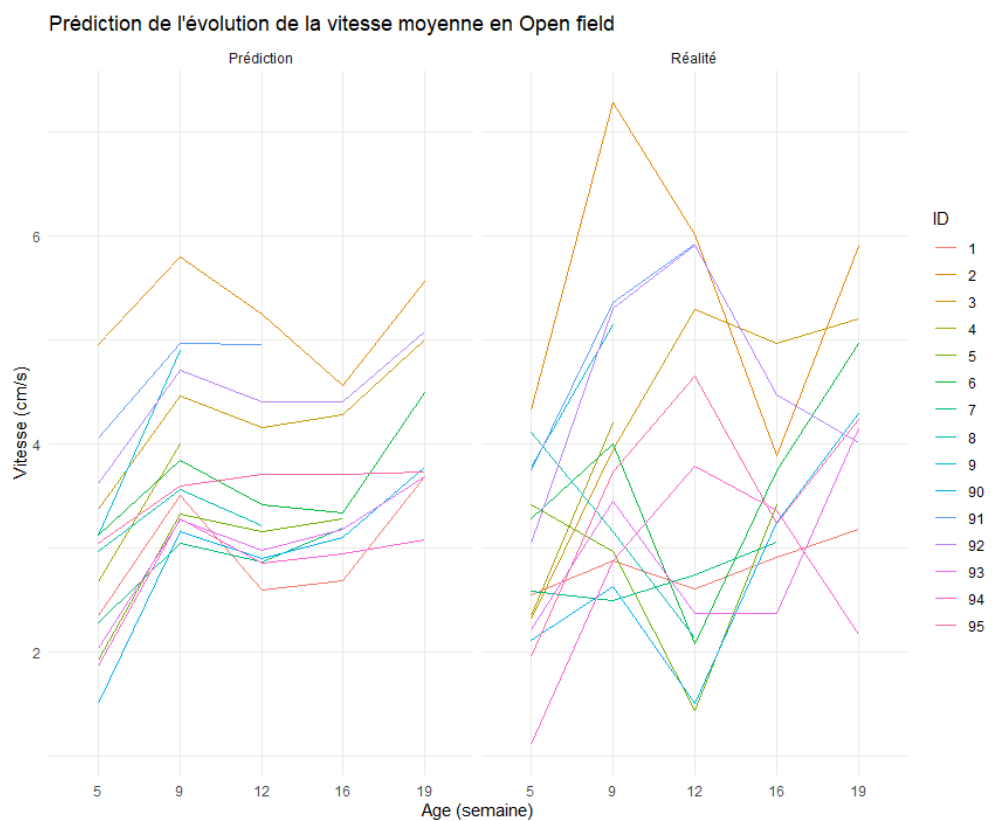


Figure 19 Evolution, par individus, de la vitesse moyenne en Open field en fonction de l'âge du poisson.

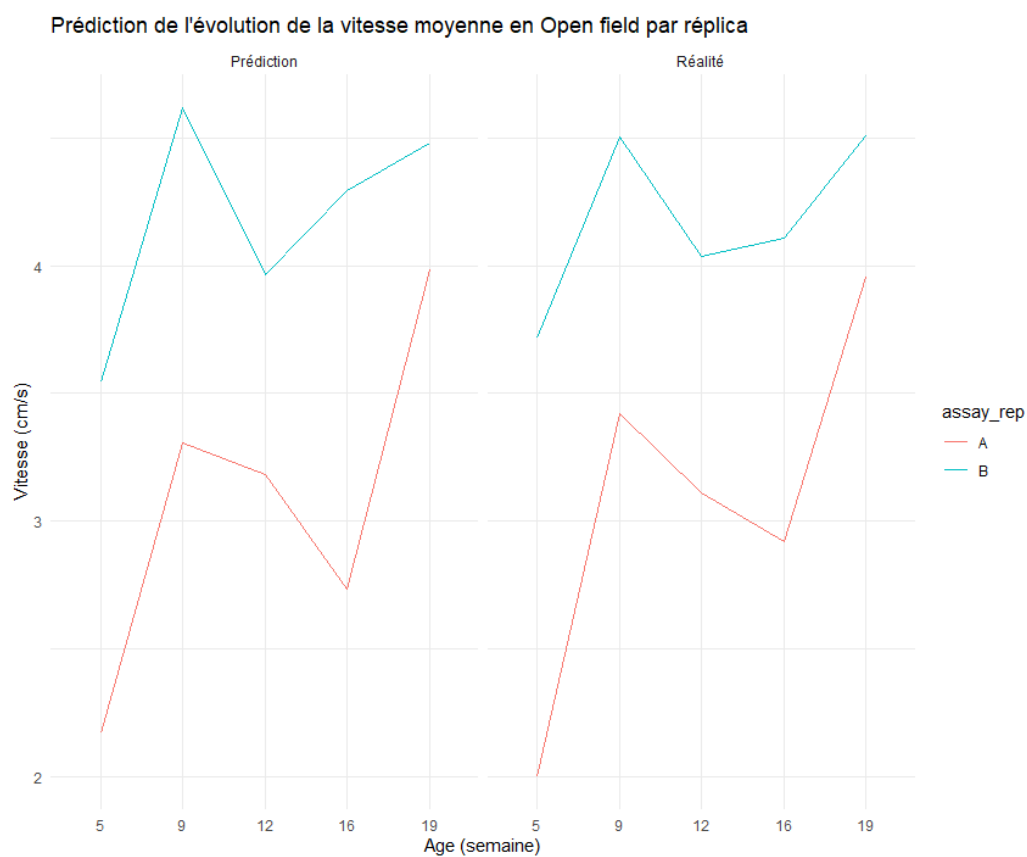


Figure 20 Evolution, par réplica, de la vitesse moyenne en Open field en fonction de l'âge du poisson.

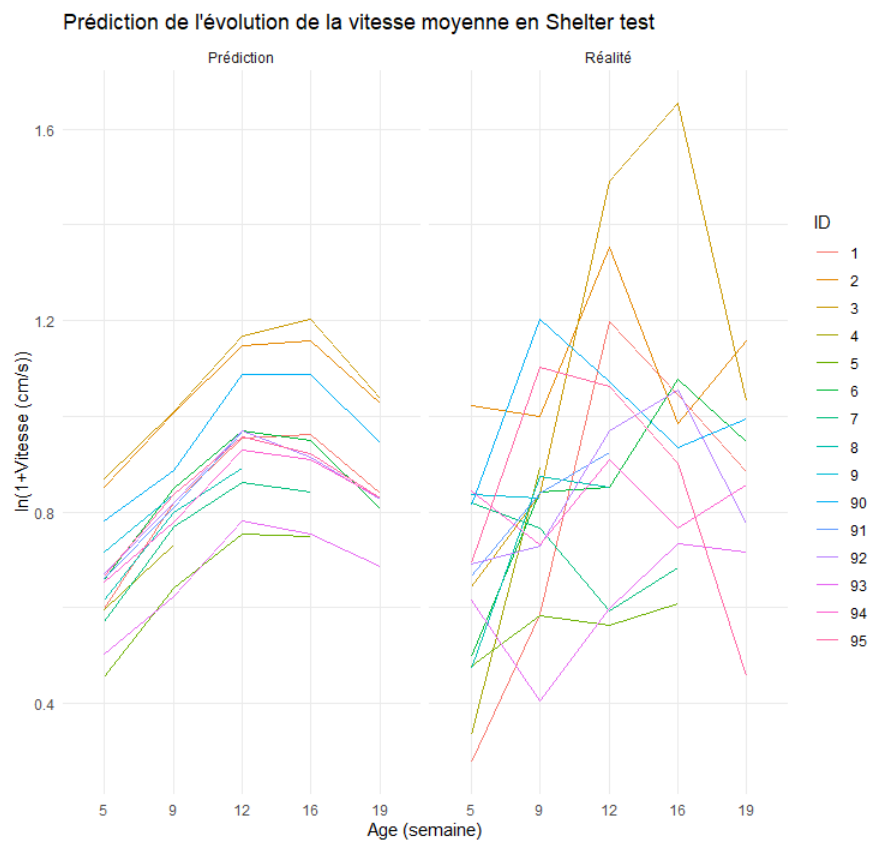


Figure 21 Evolution, par individus, de la vitesse moyenne en Shelter test en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(1+x)$.

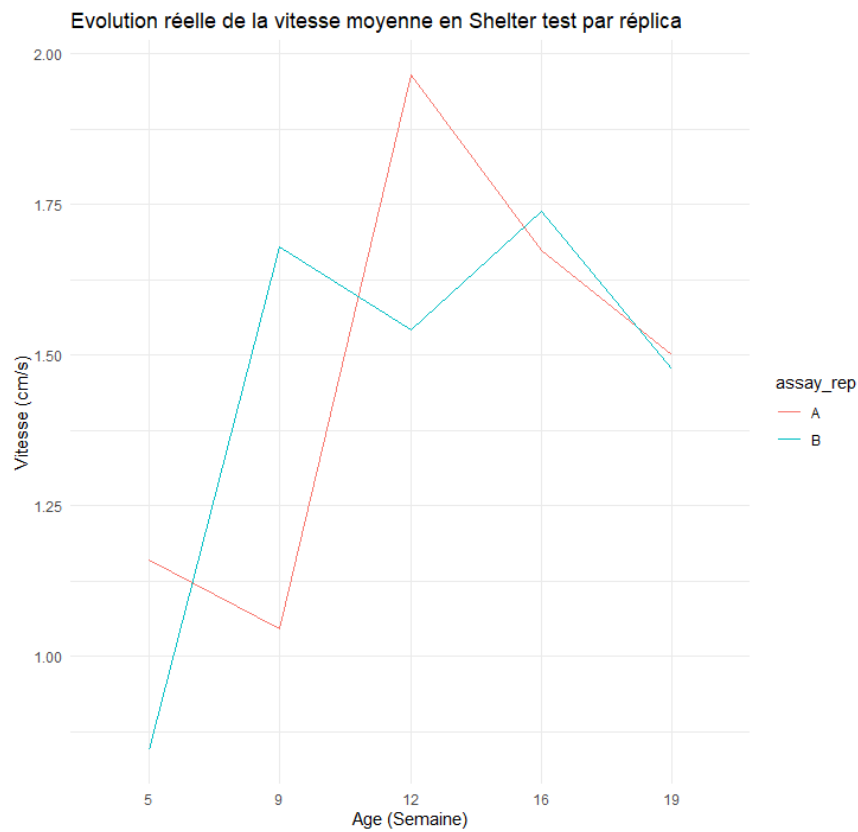


Figure 22 Evolution, par réplica, de la vitesse moyenne en Shelter test en fonction de l'âge du poisson.

Pourcentage de temps passé en mouvement : Cette variable représente le temps total pendant lequel le poisson se déplace. Le pourcentage est calculé en fonction de la durée totale de détection du poisson.

En Open field, le pourcentage de temps passé en mouvement a été modélisé en comprenant comme effets fixes l'âge, le réplica et la température. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p=0.0001713$, Réplica : $p=6.201e-06$, Température : $p=0.0111126$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 33, 35, 55, 71 et 68 pourcents de temps passé en mouvement. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne prédite à 5 semaines est significativement plus petite que les moyennes des semaines 16 et 19 et que la moyenne à 9 semaines est plus petite que la moyenne à 19 semaines. Une augmentation significative du pourcentage est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 46 et 59 pourcents de temps passé en mouvement. La répétabilité du test est significative et est de 24.9%. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 23 et Figure 24.

En Shelter test, le pourcentage de temps passé en mouvement a été expliqué par un modèle comprenant l'âge et la température. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p=2.453e-06$, Température : $p=0.02086$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 5.30, 14.96, 14.80, 11.18 et 8.58 % de temps passé en mouvement. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne à 5 semaine est significativement plus petite que les moyennes aux stades 12 et 16 semaines. La répétabilité du test est significative et est de 20.8%. Aucune différence entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 25 et Figure 26.

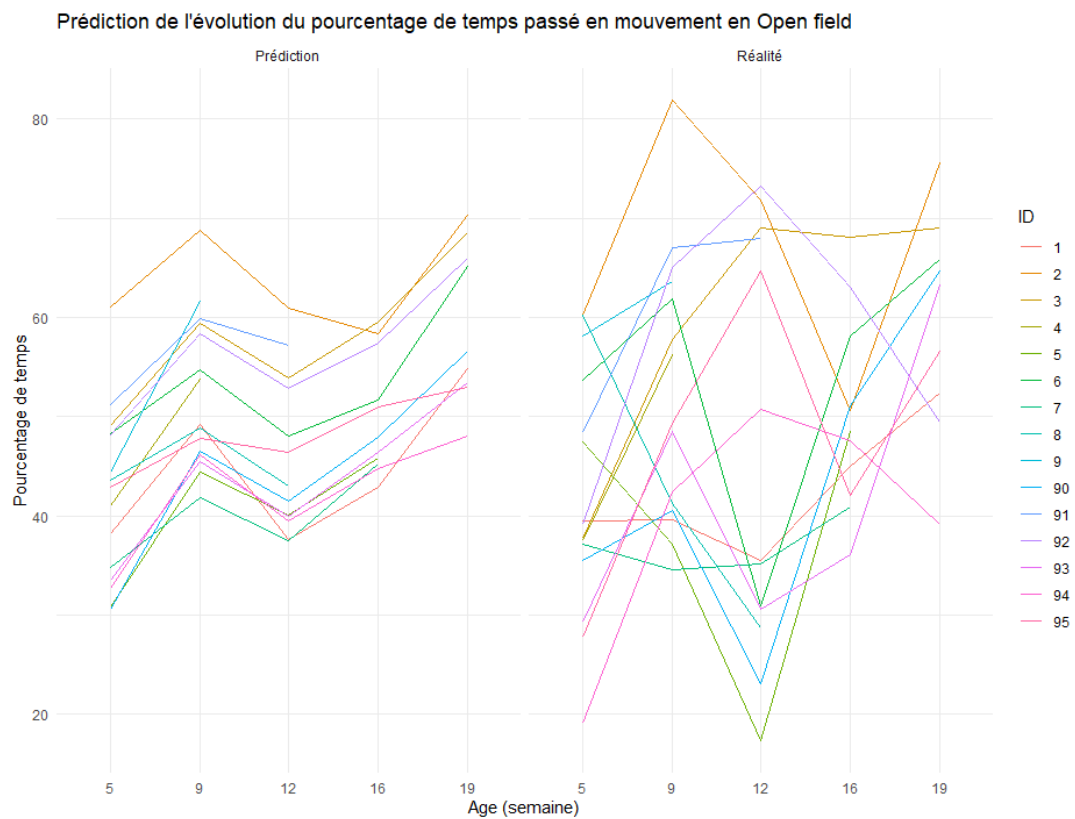


Figure 23 Evolution, par individus, du pourcentage de temps passé en mouvement en Open field en fonction de l'âge du poisson.

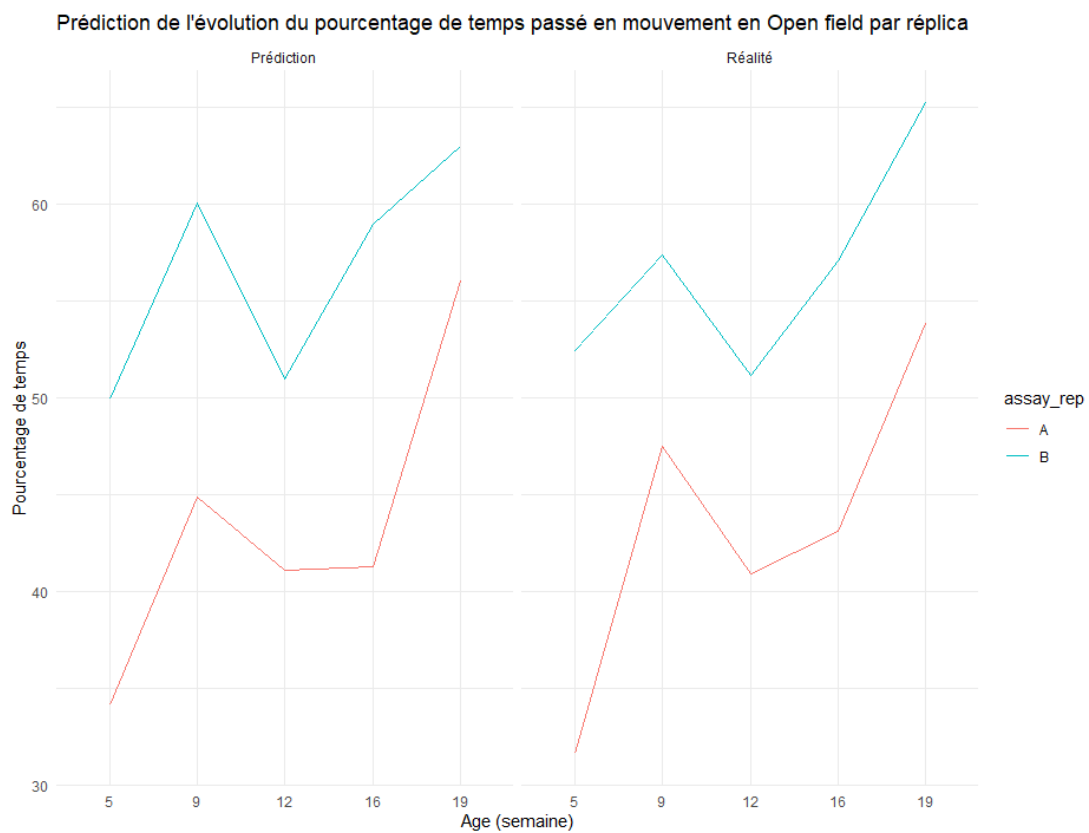


Figure 24 Evolution, par réplica, du pourcentage de temps passé en mouvement en Open field en fonction de l'âge du poisson.

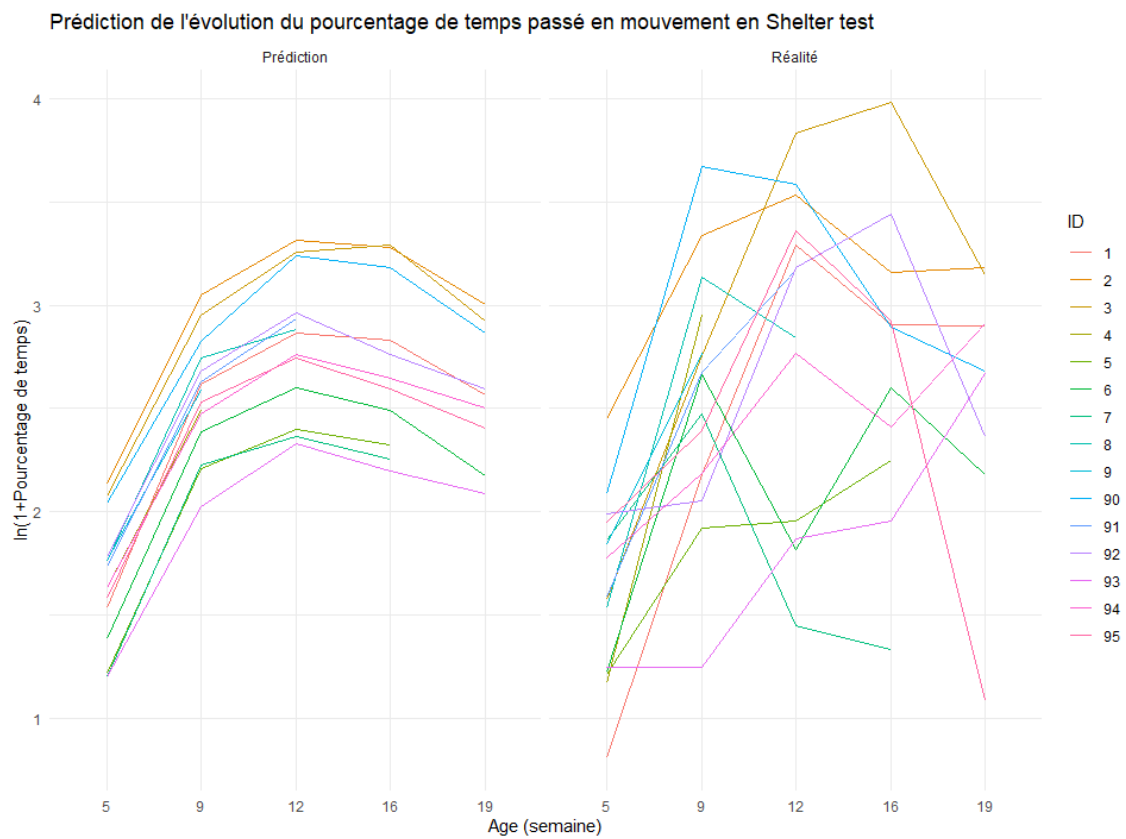


Figure 25 Prédiction, par individus, du pourcentage de temps passé en mouvement en Shelter test en fonction de l'âge du poisson. Les données ont été transformées en $\ln(1+x)$.

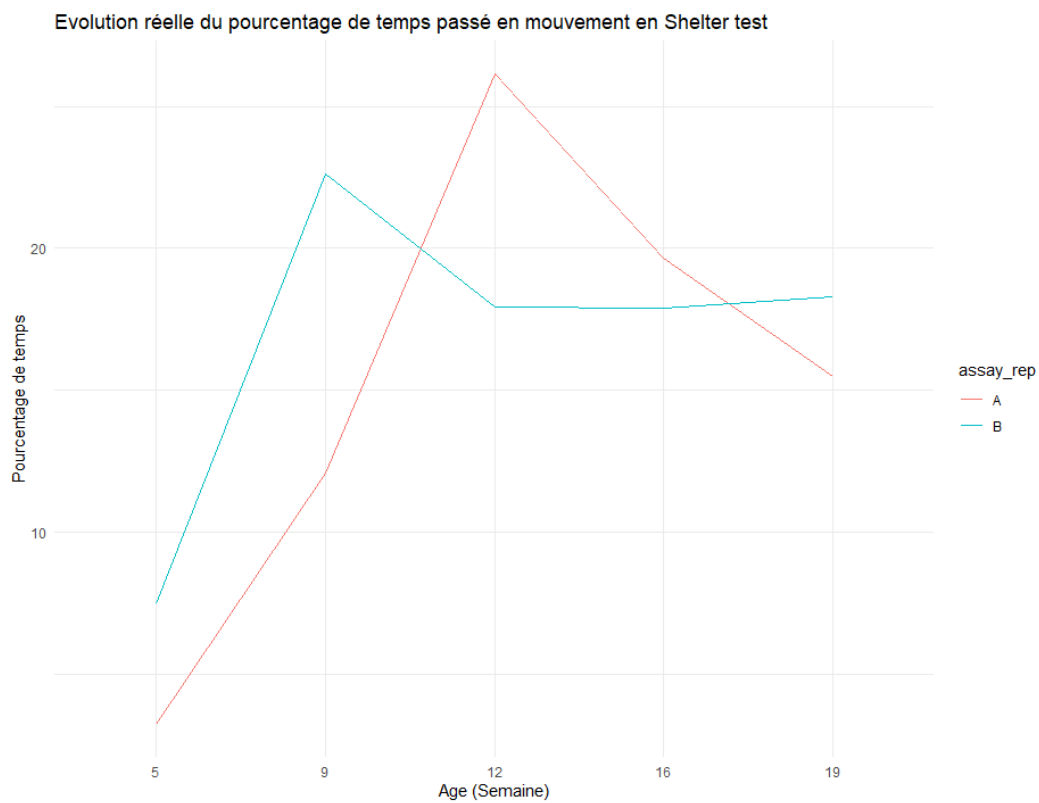


Figure 26 Evolution, par réplica, du pourcentage de temps passé en mouvement en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

Fréquence de mise en mouvement : Cette variable représente le comptage du nombre de mise en mouvement de l'individu étudié. Par extension, cette variable représente également la fréquence d'arrêt du poisson.

La fréquence de mise en mouvement en Open field n'a pas pu être modélisée. Les évolutions moyennes de la variable sont visualisables en Figure 27.

En Shelter test, la fréquence de mise en mouvement a été modélisée en comprenant comme effets fixes l'âge, la température, la taille et le poids. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (toutes les p-values sont inférieures à 2.2×10^{-16}). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 1249, 1510, 992, 659 et 469 mises en mouvement. Après réalisation de contrastes il semblerait que toutes les moyennes soient différentes entre elles. La répétabilité du test n'a pas pu être calculée car le modèle a été réalisé par glm mais un effet significatif de l'individualité sur l'évolution de la variable a été mis en évidence. Aucune différence entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 32, Figure 31 et Figure 30.

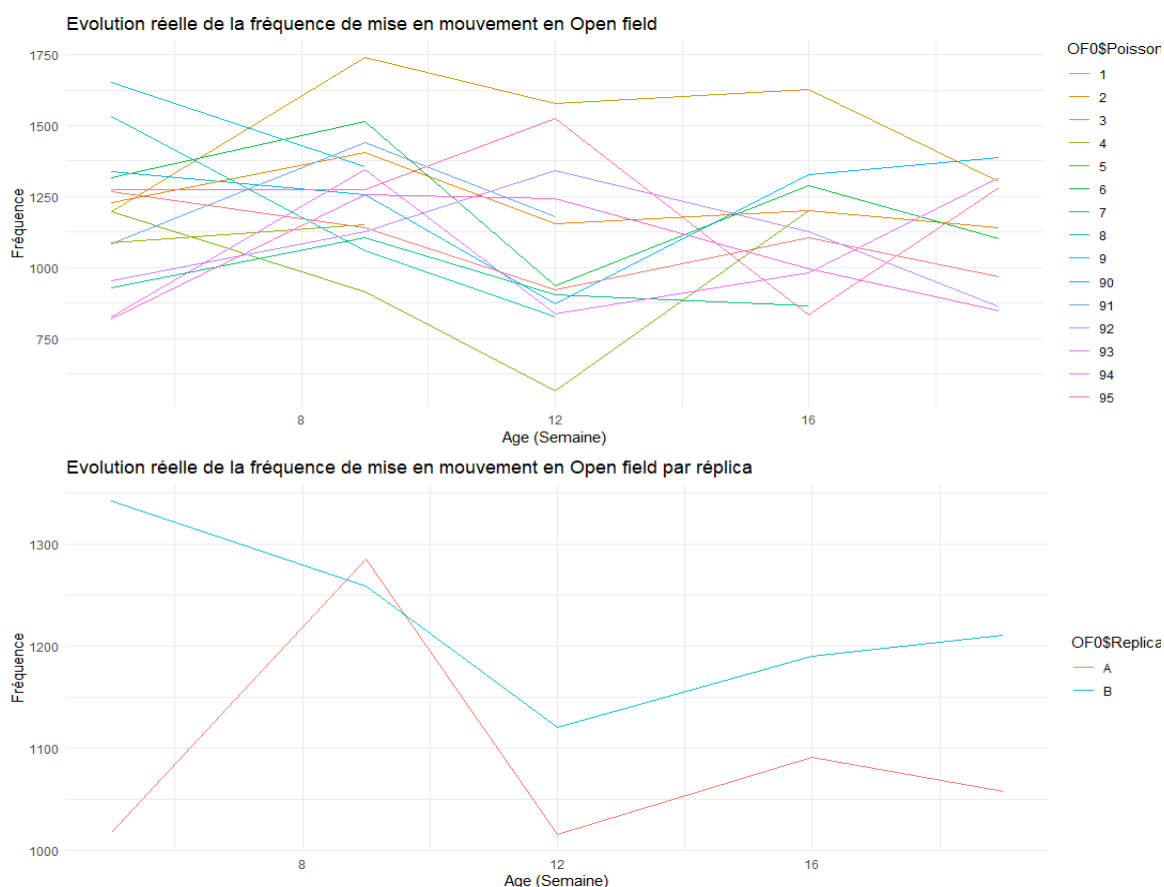


Figure 27 Evolution, de la fréquence de mise en mouvement en Open field, en fonction de l'âge. Au-dessus : par individus, en dessous : par réplicas.

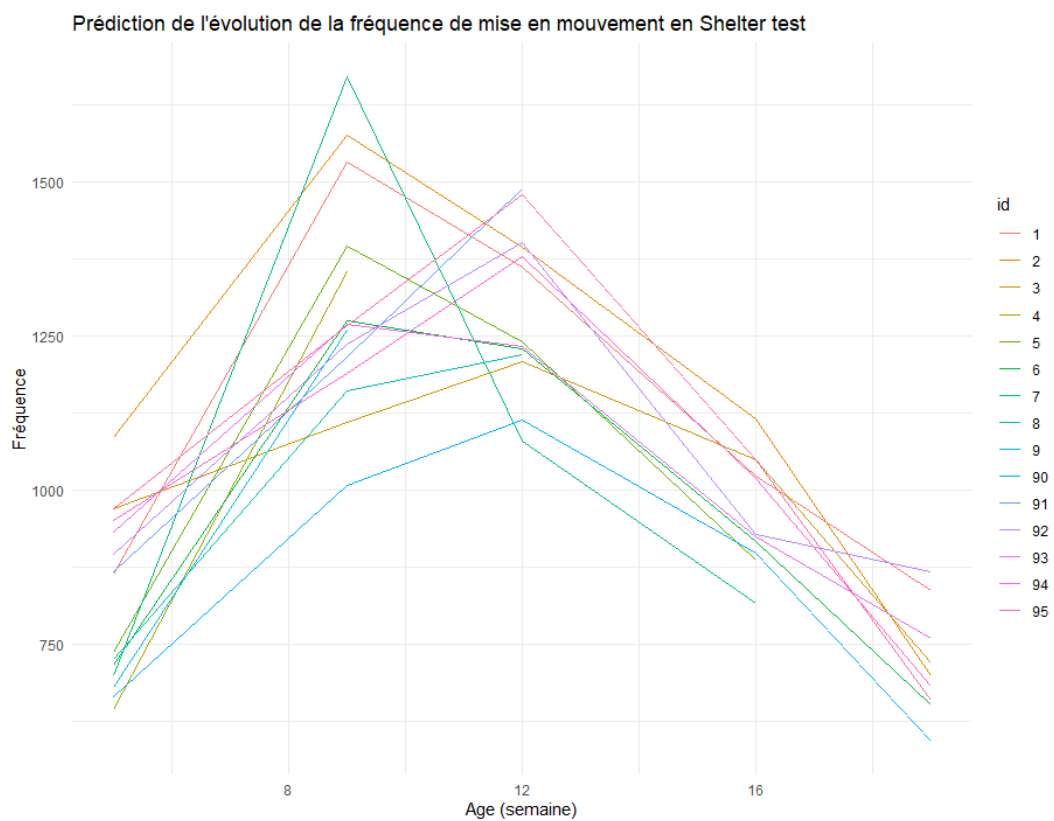


Figure 28 Prédiction, par individus, de la fréquence de mise en mouvement en Shelter test en fonction de l'âge du poisson.

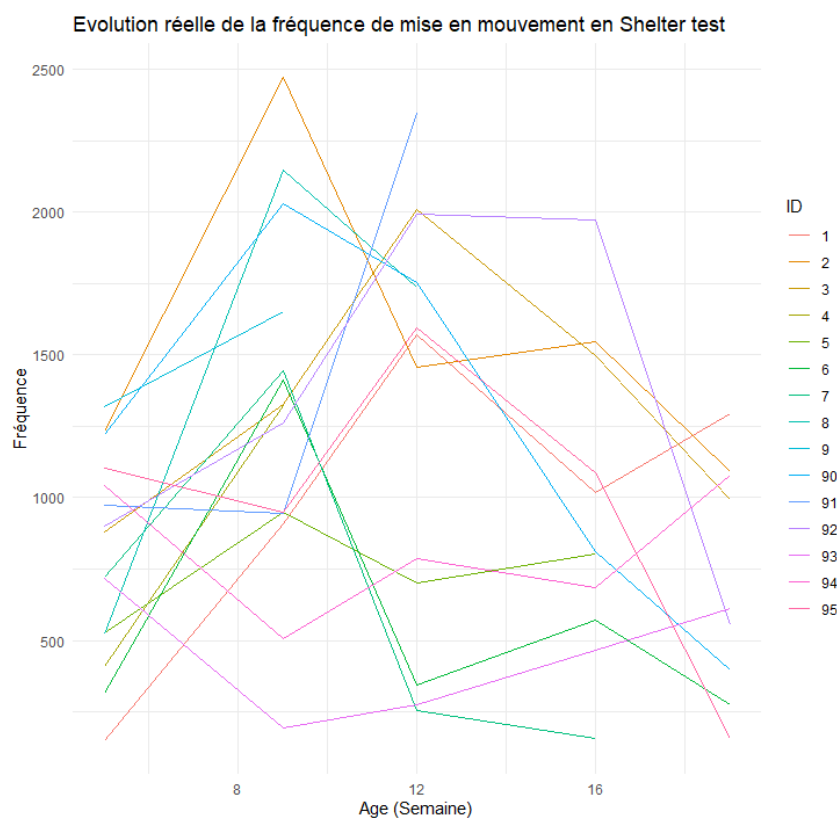


Figure 29 Evolution, par individus, de la fréquence de mise en mouvement en Shelter test en fonction de l'âge du poisson.

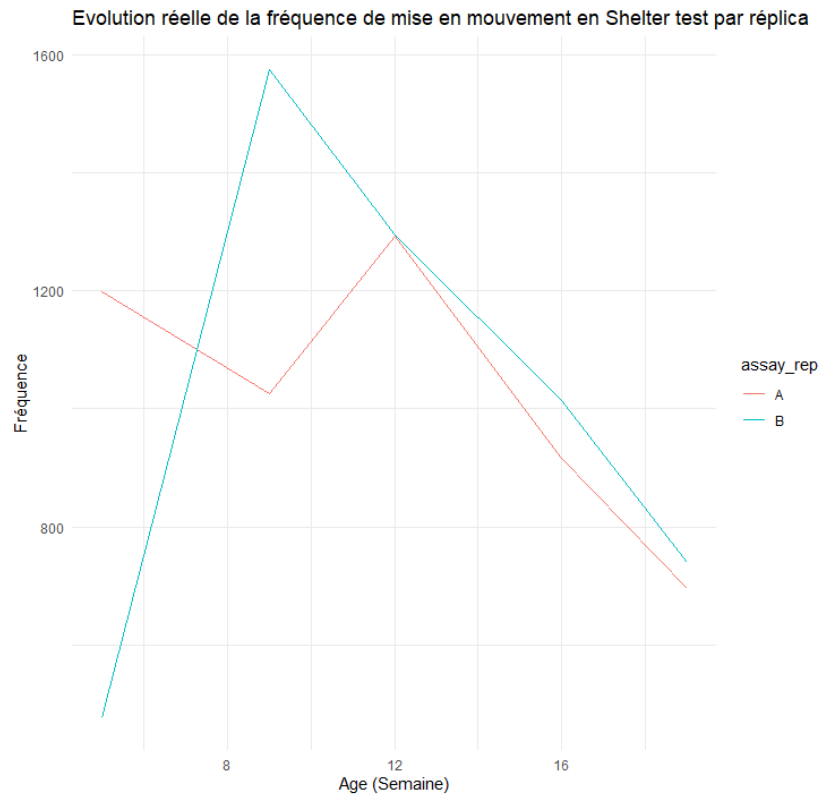


Figure 30 Evolution, par réplicas, de la fréquence de mise en mouvement en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

Fréquence de rotation : Cette variable représente le comptage du nombre de rotations du poisson tout au long du test. Une rotation est définie comme un tour de 360 du bout de la queue de l'individu autour de son centre de détection.

En Open field, la fréquence de rotation a été modélisée en incluant l'âge, le réplica et le poids comme effets fixes. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p < 2.2 \times 10^{-16}$, Réplica : $p < 2.2 \times 10^{-16}$, Poids : $p = 9.009 \times 10^{-14}$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 45, 38, 28, 29 et 22 rotations. Après contrastes, il a été mis en évidence que toutes les moyennes sont différentes entre elles sauf pour les moyennes des âges 5-9 et 12-16 entre elles. Une augmentation significative de la fréquence de rotation est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 26 et 38 rotations. La répétabilité du test n'a pas pu être calculée car le modèle a été réalisé par glm mais un effet significatif de l'individualité sur l'évolution de la variable a été mis en évidence. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 31, Figure 32, Figure 33 et Figure 34.

En Shelter test, la fréquence de rotation a été modélisée en incluant l'âge, le poids et la conductivité comme effets fixes. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p = 1.010 \times 10^{-11}$, Réplica : $p = 0.004115$, Poids : $p = 4.745 \times 10^{-6}$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 9, 15, 12, 18 et 10 rotations. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne à 9 semaine est significativement plus grande que la moyenne à 5 et 19 semaines et que la moyenne à 16 semaines est significativement plus grande que les moyennes à 5, 12 et 19 semaines. La répétabilité du test n'a pas pu être calculée car le modèle a été réalisé par glm mais un effet significatif de l'individualité a été mis en évidence. Aucune différence entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 35, Figure 36 et Figure 37.

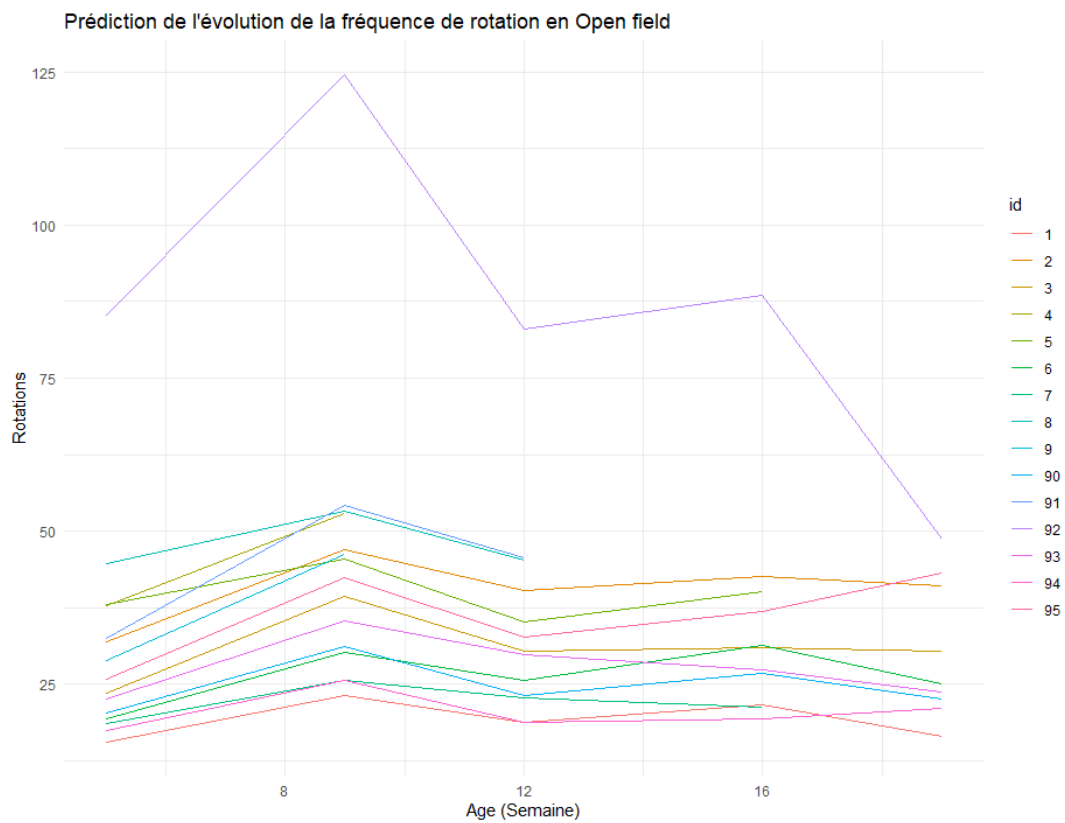


Figure 31 Prédiction, par individus, de la fréquence de rotation en Open field en fonction de l'âge du poisson

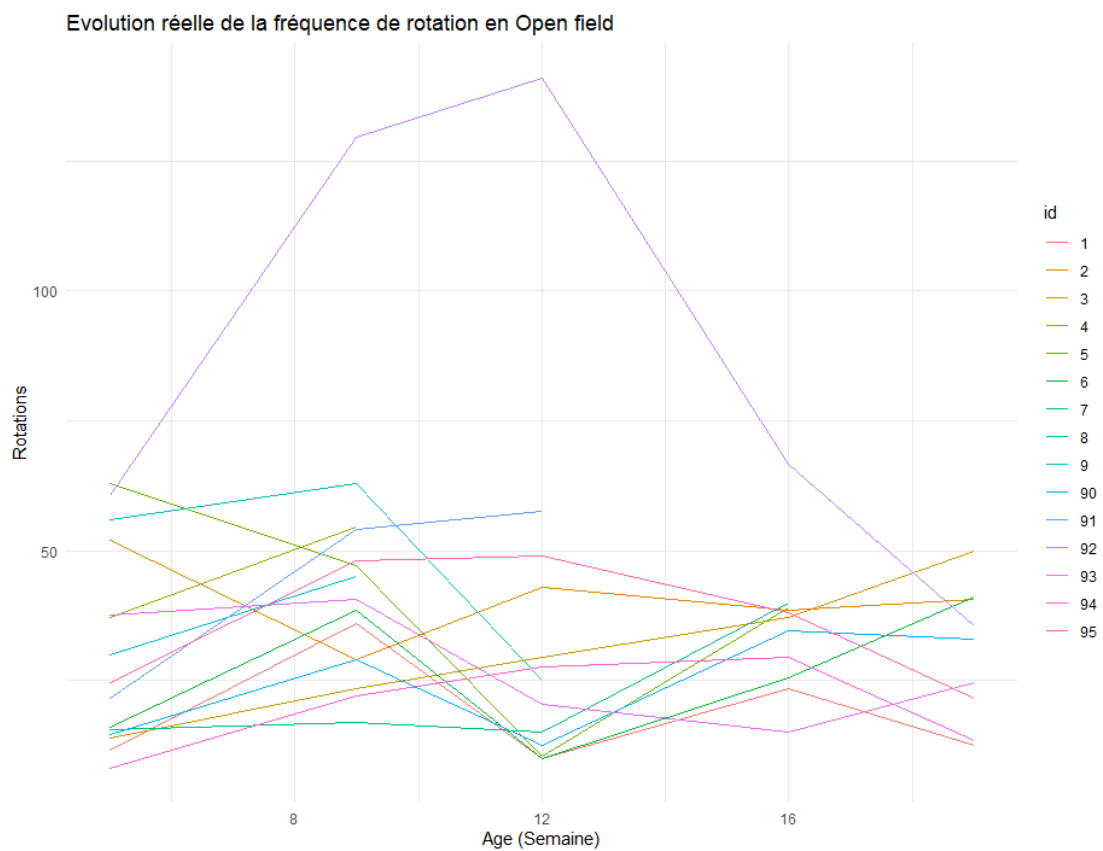


Figure 32 Evolution, par individus, de la fréquence de rotation en Open field en fonction de l'âge du poisson

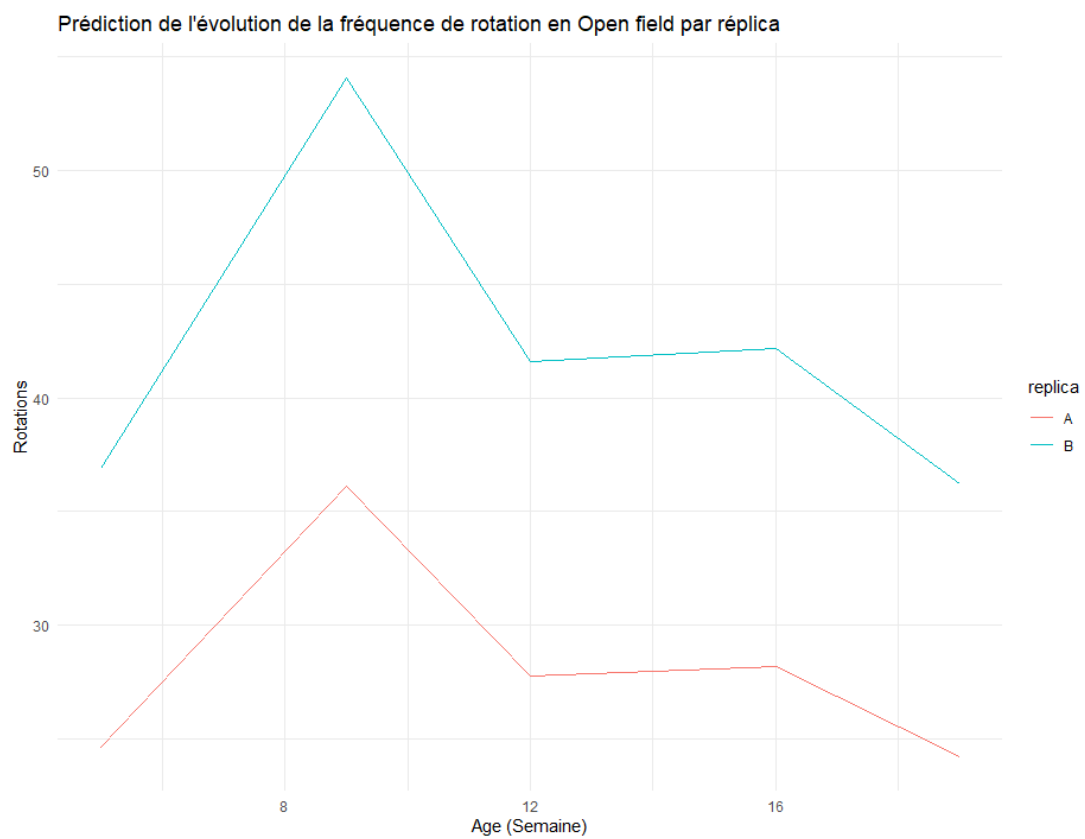


Figure 33 Prédiction, par réplica, de la fréquence de rotation en Open field en fonction de l'âge du poisson

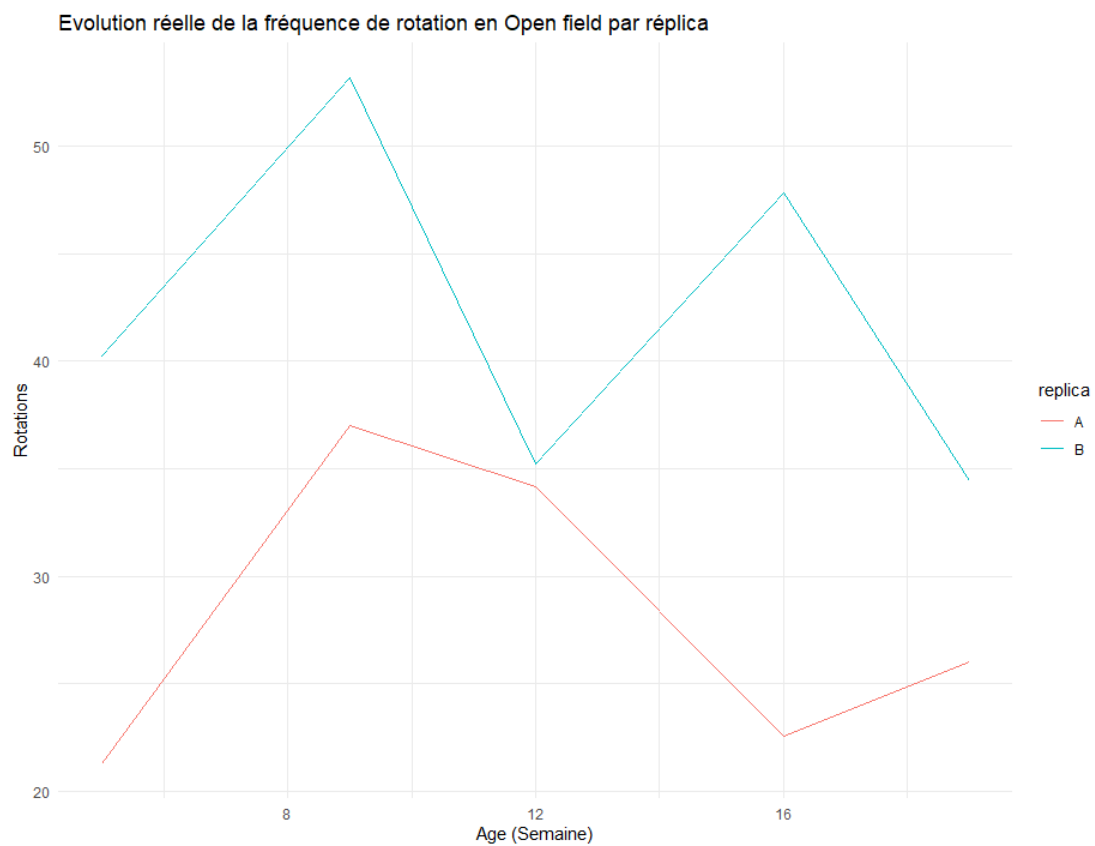


Figure 34 Evolution, par réplica, de la fréquence de rotation en Open field en fonction de l'âge du poisson

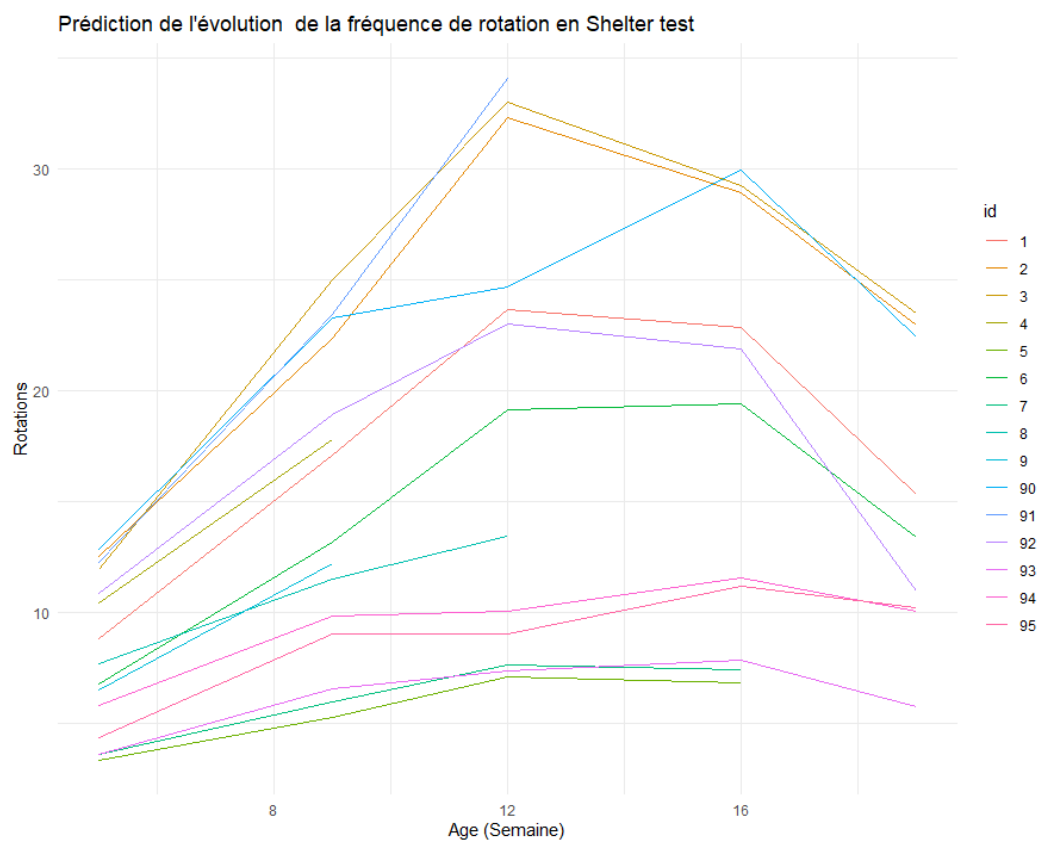


Figure 35 Prédiction, par individus, de la fréquence de rotation en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

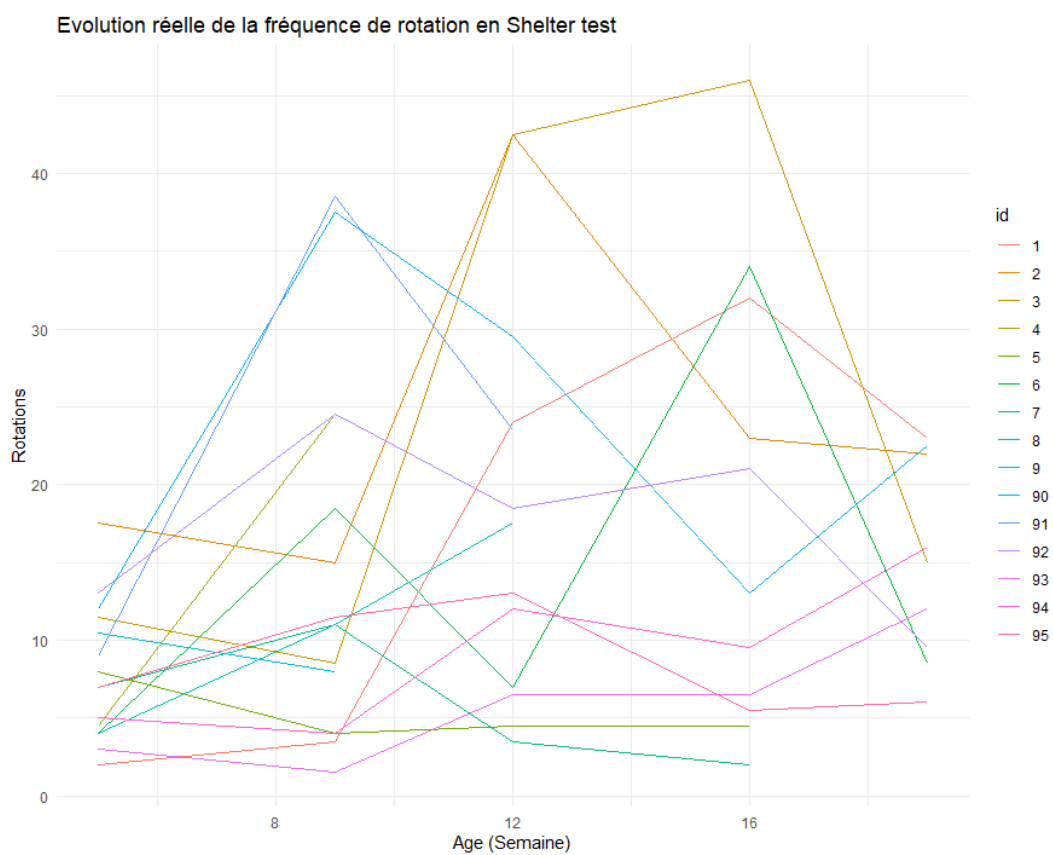


Figure 36 Evolution, par individus, de la fréquence de rotation en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

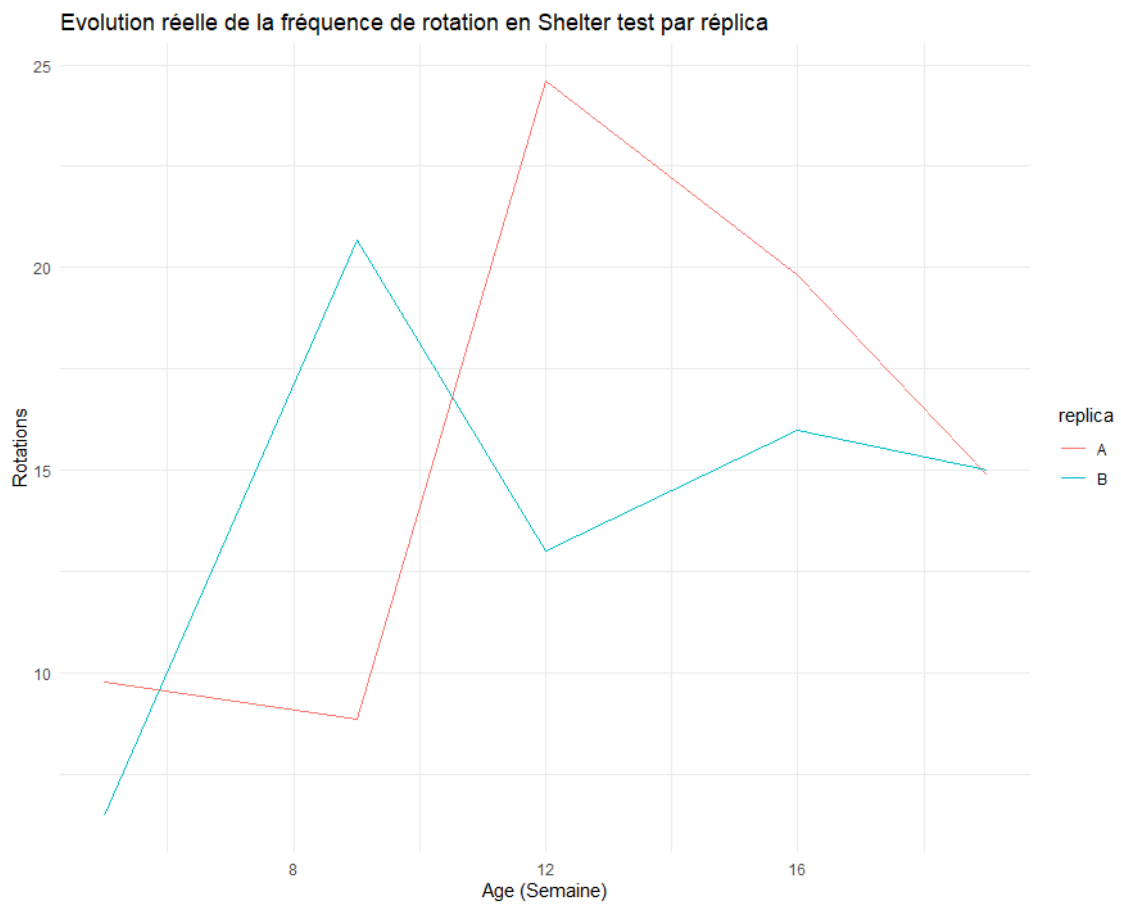


Figure 37 Evolution, par réplica, de la fréquence de rotation en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

Mobilité moyenne : Cette variable représente le pourcentage moyen de masse corporelle en mouvement du poisson.

En Open field, la mobilité moyenne a été modélisée et expliquée par l'âge comme effet fixe. L'effet fixe sur l'évolution de la variable est significatif avec une p-valeur inférieure à 2.2×10^{-16} . Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 4.6, 13.8, 12.0, 12.1 et 11.9 % de masse corporelle en mouvement. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne prédite à 5 semaines est significativement différente des autres moyennes. Aucune différence entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. La répétabilité du test n'a pas pu être évaluée car l'effet individuel sur la divergence de la réponse au test est considéré comme non significatif. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 38 et Figure 39.

En Shelter test, la mobilité moyenne a été modélisée en incluant les effets fixes de l'âge et du réplica. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p < 2.2 \times 10^{-16}$, Réplica : $p = 3.554 \times 10^{-7}$). La mobilité augmente drastiquement des stades 5 à 9 semaines puis reste constante au fil du vieillissement. Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 1.87, 6.17, 6.61, 6.17 et 5.23 % de masse corporelle en mouvement. Après contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne à 5 semaine est significativement différente des autres stades de vie. Une augmentation significative de la mobilité est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 3.95 et 6.02 % de masse corporelle en mouvement. La répétabilité du test n'a pas pu être évaluée car l'effet individuel sur la divergence de la réponse au test est considéré comme non significatif. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 40 et Figure 41.

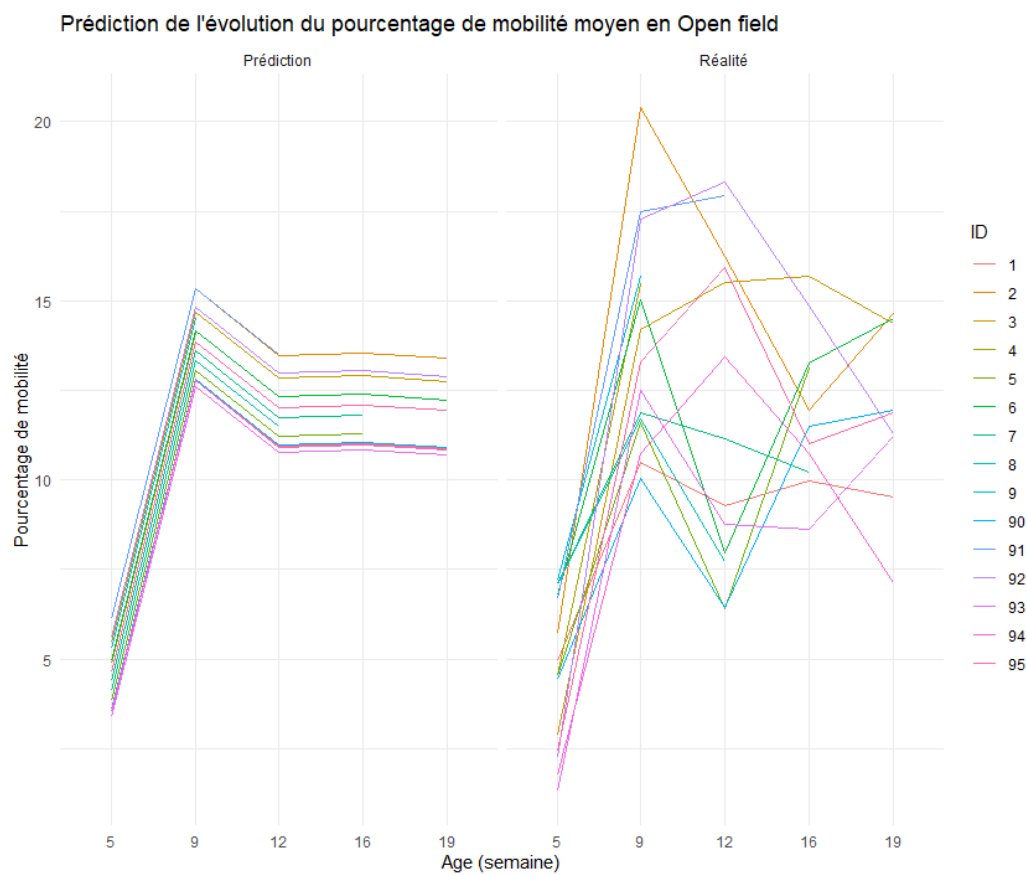


Figure 38 Prédiction, par individus, de la mobilité moyenne en Open field en fonction de l'âge du poisson.

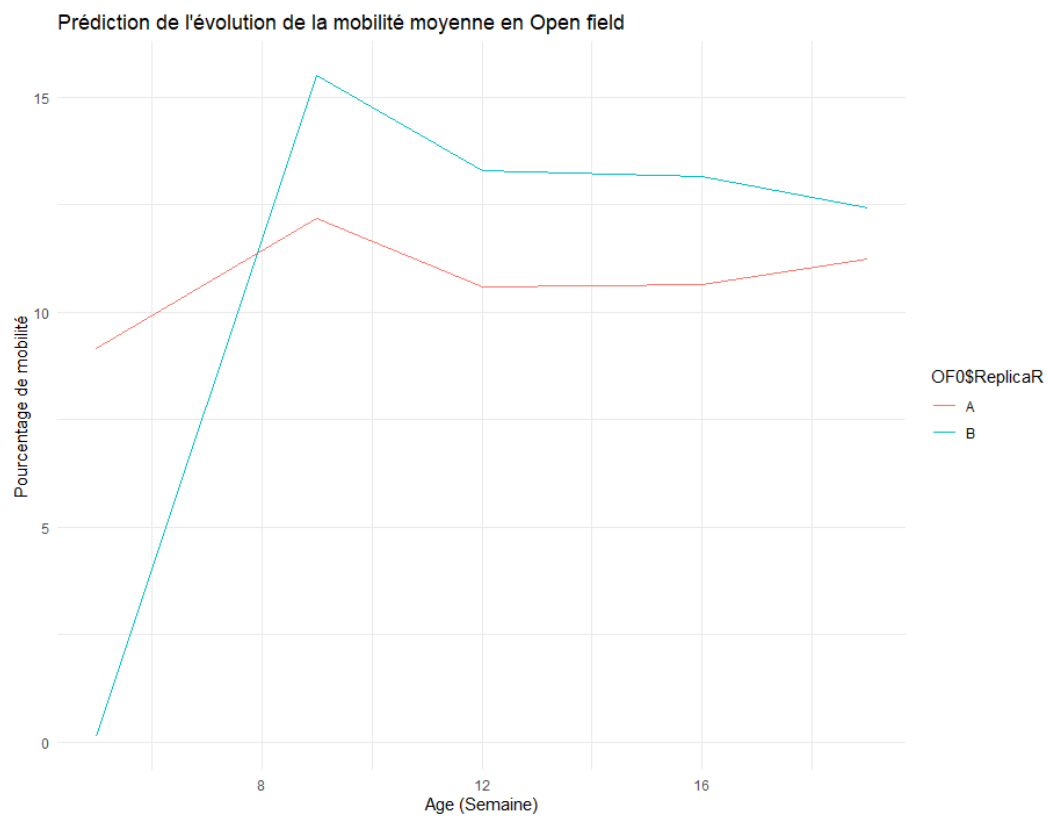


Figure 39 Evolution, par réplica, de la mobilité moyenne en Open field en fonction de l'âge du poisson.

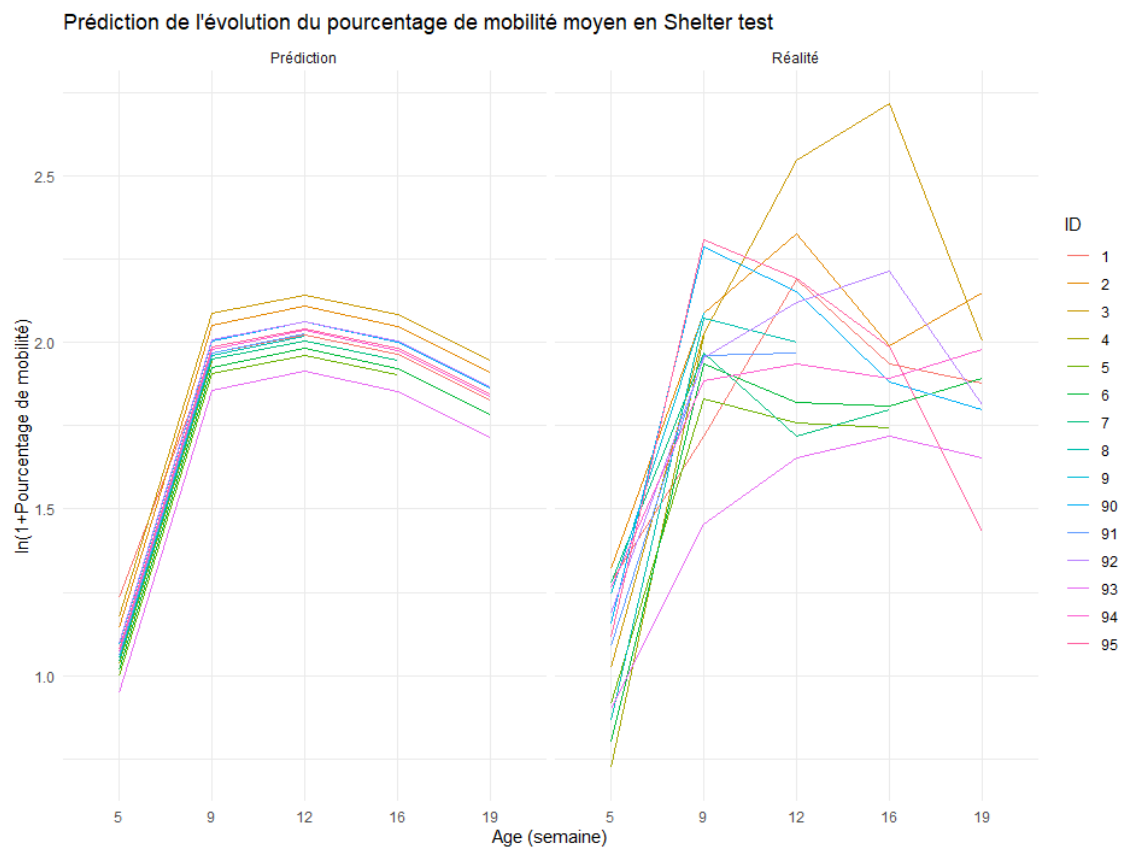


Figure 40 Prédiction, par individus, de la mobilité moyenne en Shelter test en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(1+x)$.

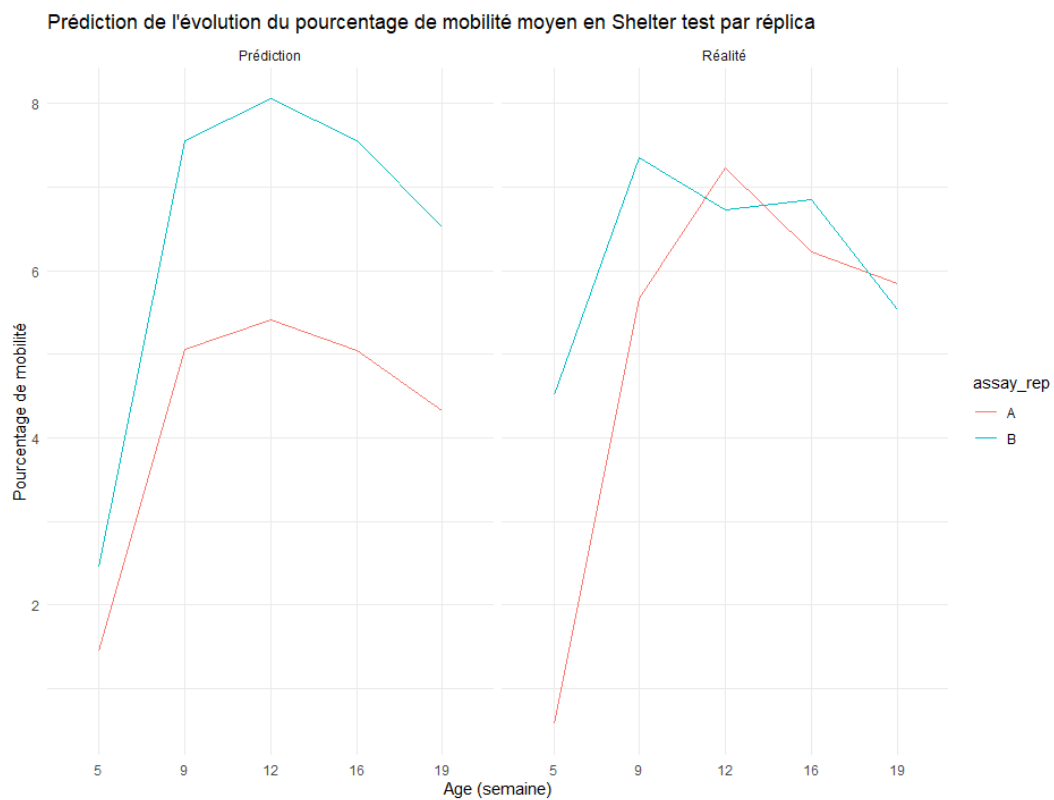


Figure 41 Prédiction, par réplica, de la mobilité moyenne en Shelter test en fonction de l'âge du poisson

3.2. Variables spécifiques à chaque test

3.2.1. Open field

Les variables étudiées dans cette section sont associées à l'étude de thigmotaxie et sont caractéristiques de la zone centrale virtuelle précédemment conçue.

Latence avant rentrée dans la zone centrale (s) : Cette variable représente le temps passé avant la première rentrée du poisson dans la zone centrale.

Cette variable a pu être expliquée par un modèle comprenant l'âge et le réplica comme effets fixes. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p=0.03969$, Réplica : $p=0.02540$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 280, 191, 309, 280 et 87 secondes avant rentrée dans la zone centrale. Après réalisation de contrastes, il semblerait que la diminution du temps de latence entre les âges de 12 et 19 semaines soit significative. Une augmentation significative de la latence est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 166 et 279 secondes. La répétabilité du test est significative et est de 11.2%. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 42 et Figure 43.

Fréquence de rentrée dans la zone centrale : Cette variable est un comptage du nombre de rentrées dans la zone centrale. Par extension, c'est aussi la fréquence de sortie de cette zone.

Pour cette variable, un modèle comprenant l'âge, le poids et le réplica comme effets fixes a été créé. Les effets fixes sont significatifs (Age : $p<2.2e-16$, Réplica : $p=3.913e-07$, Poids : $p=0.0002477$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 2, 7, 5, 5 et 17 rentrées dans la zone centrale. Après réalisation de contrastes, il a été mis en évidence que la moyenne à 5 semaines est significativement plus petite et que la moyenne à 19 semaines est significativement plus grande que les autres moyennes. Une diminution significative de la fréquence est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 7 et 5 rentrées dans la zone centrale. La répétabilité du test n'a pas pu être calculée car le modèle a été réalisé par glm mais un effet significatif de l'individualité a été mis en évidence. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 44, Figure 45, Figure 46 et Figure 47.

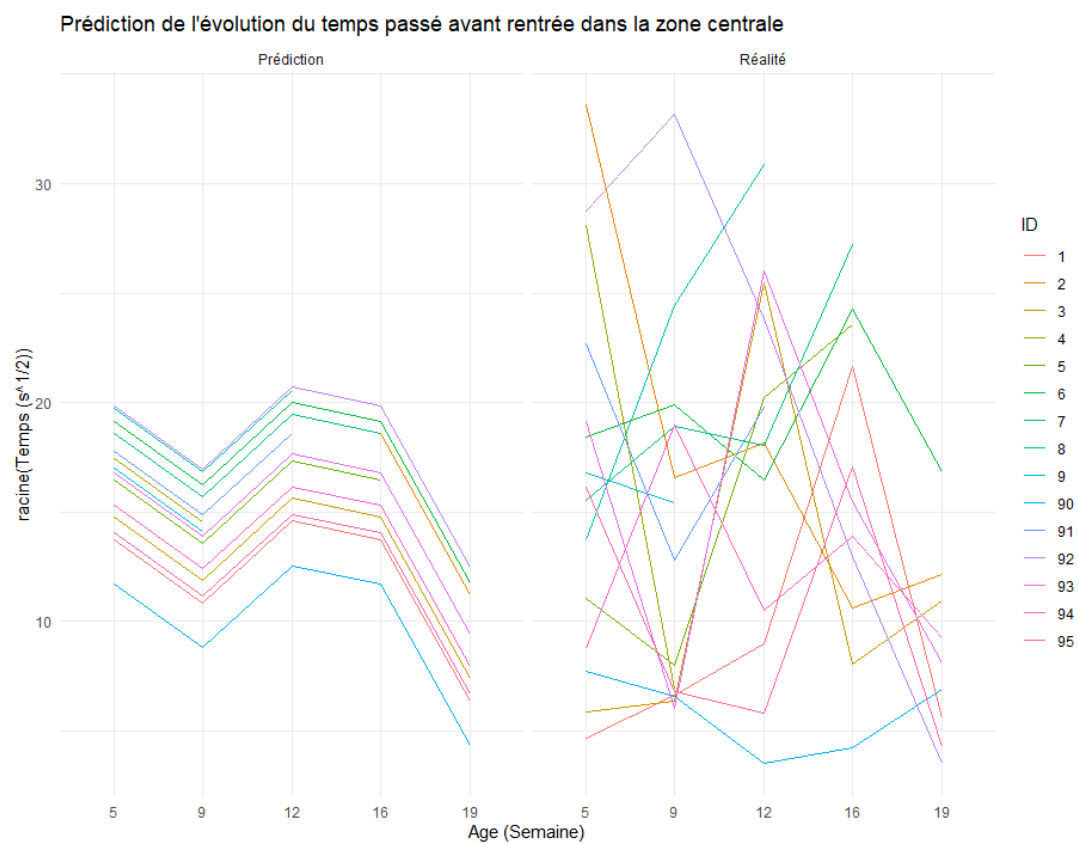


Figure 42 Prédiction, par individus, de la latence avant rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en racine carrées.

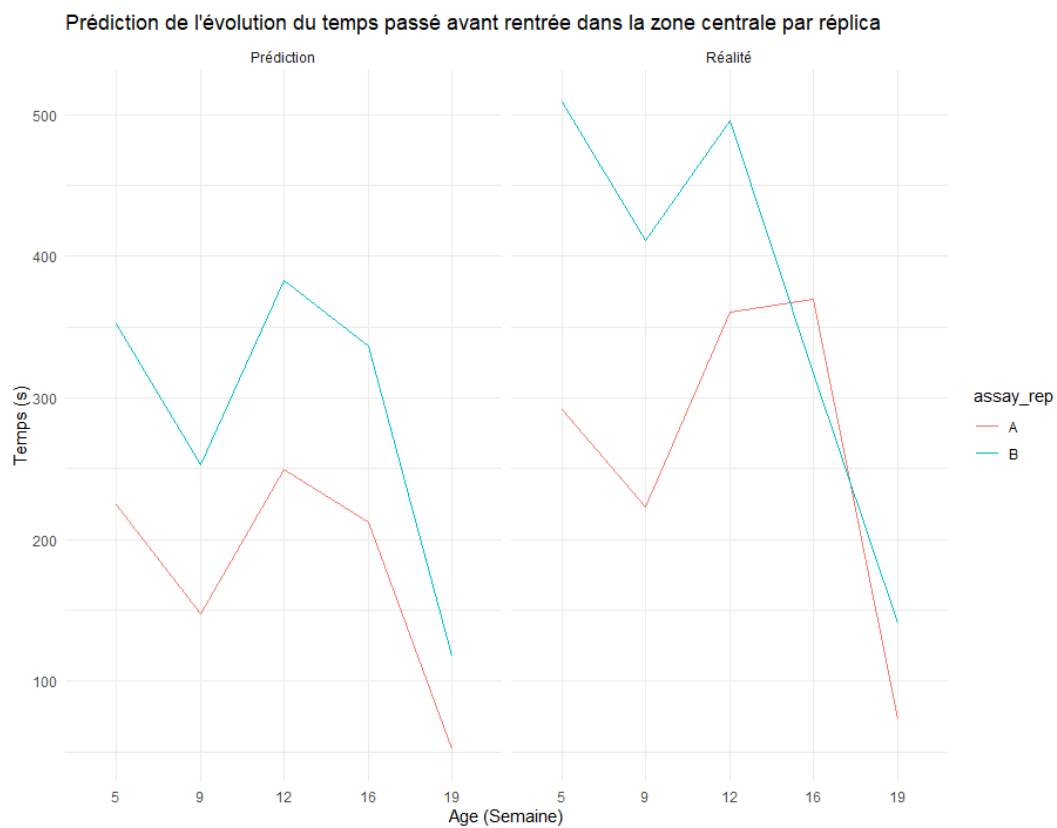


Figure 43 Prédiction, par réplica, de la latence avant rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson.

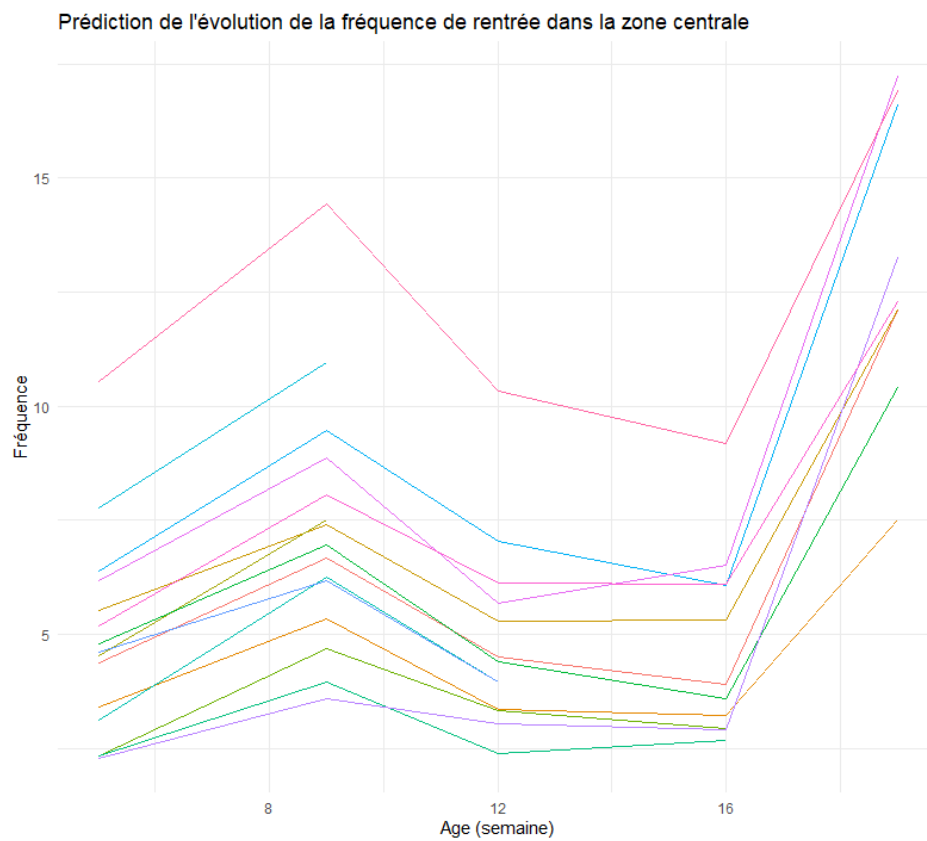


Figure 44 Prédiction, par individus, de la fréquence de rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson.

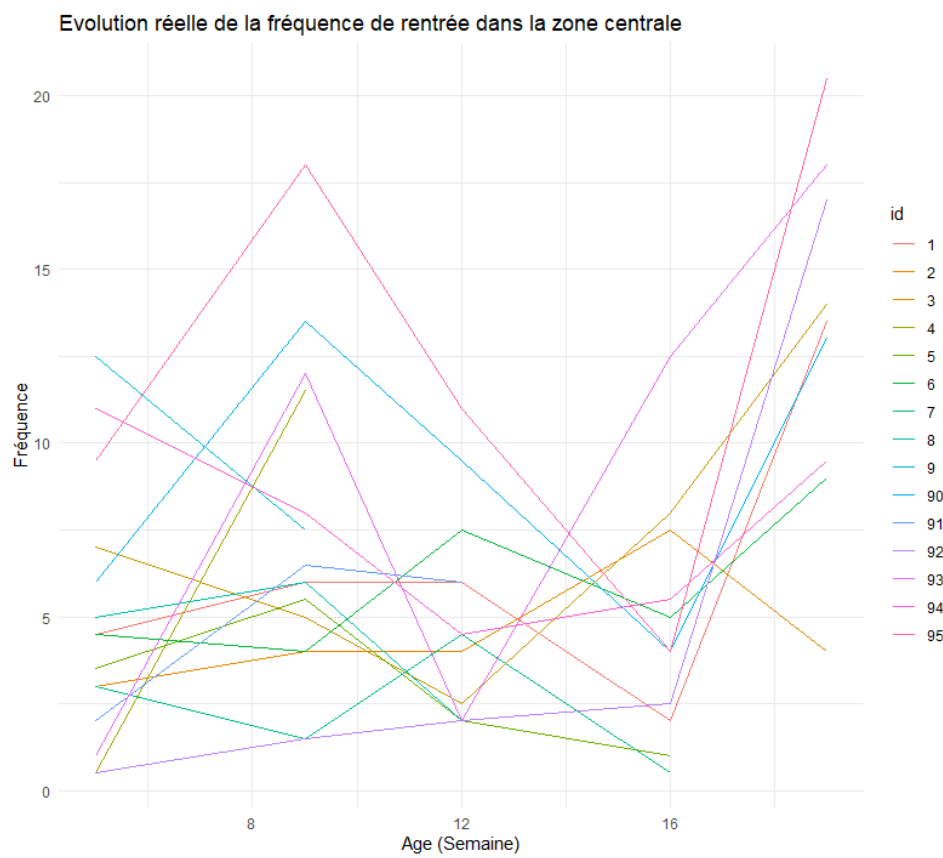


Figure 45 Evolution, par individus, de la fréquence de rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson

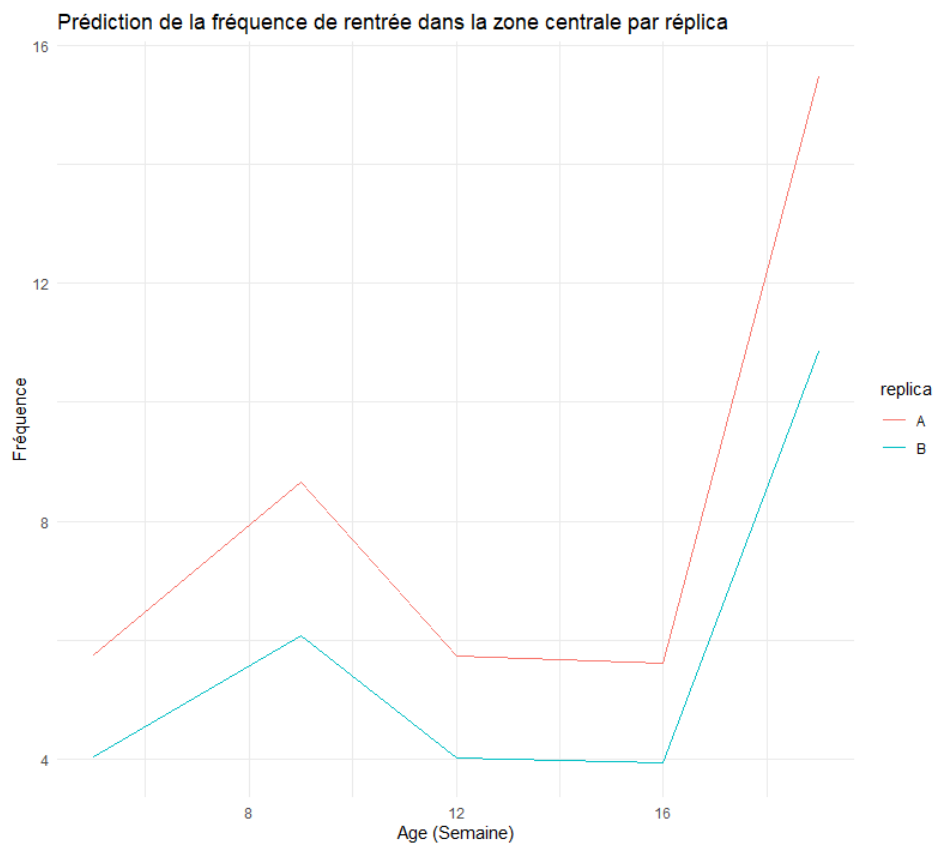


Figure 46 Prédiction, par réplica, de la fréquence de rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson

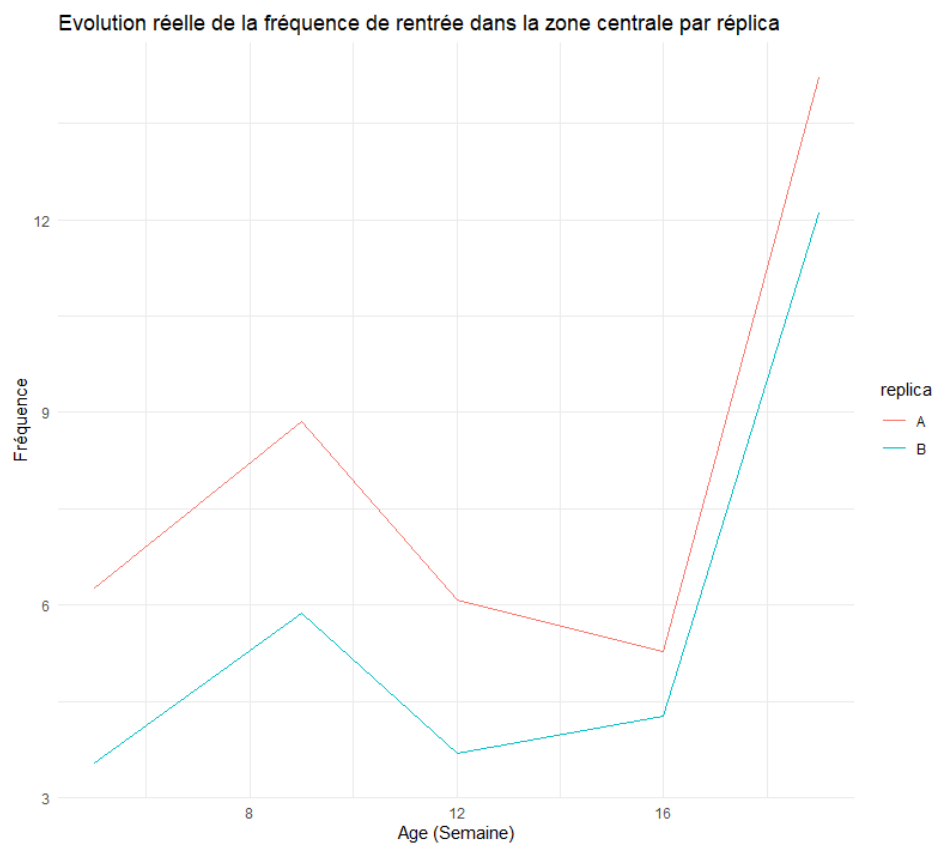


Figure 47 Evolution, par réplica, de la fréquence de rentrée dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson

Temps total passé dans la zone centrale (s) : Cette variable représente la durée totale de détection du poisson à l'intérieur de la zone centrale.

Pour cette variable, un modèle incluant les effets fixes de l'âge et du réplica a été créé. Les effets fixes sur l'évolution de la variables sont significatifs (Age : $p=0.001374$, Réplica : $p=6.117e-06$). Les moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines sont de 8.6, 8.8, 5.4, 6.3 et 19.5 secondes passées dans la zone centrale. Selon les contrastes réalisés, il semble que la moyenne prédite à 19 semaines est significativement plus grande que les moyennes prédites à 12 et 16 semaines. Une diminution significative de la durée est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 13.6 et 5.6 secondes passées dans la zone centrale. La répétabilité du test est significative et est de 22.5 %. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 48 et Figure 49.

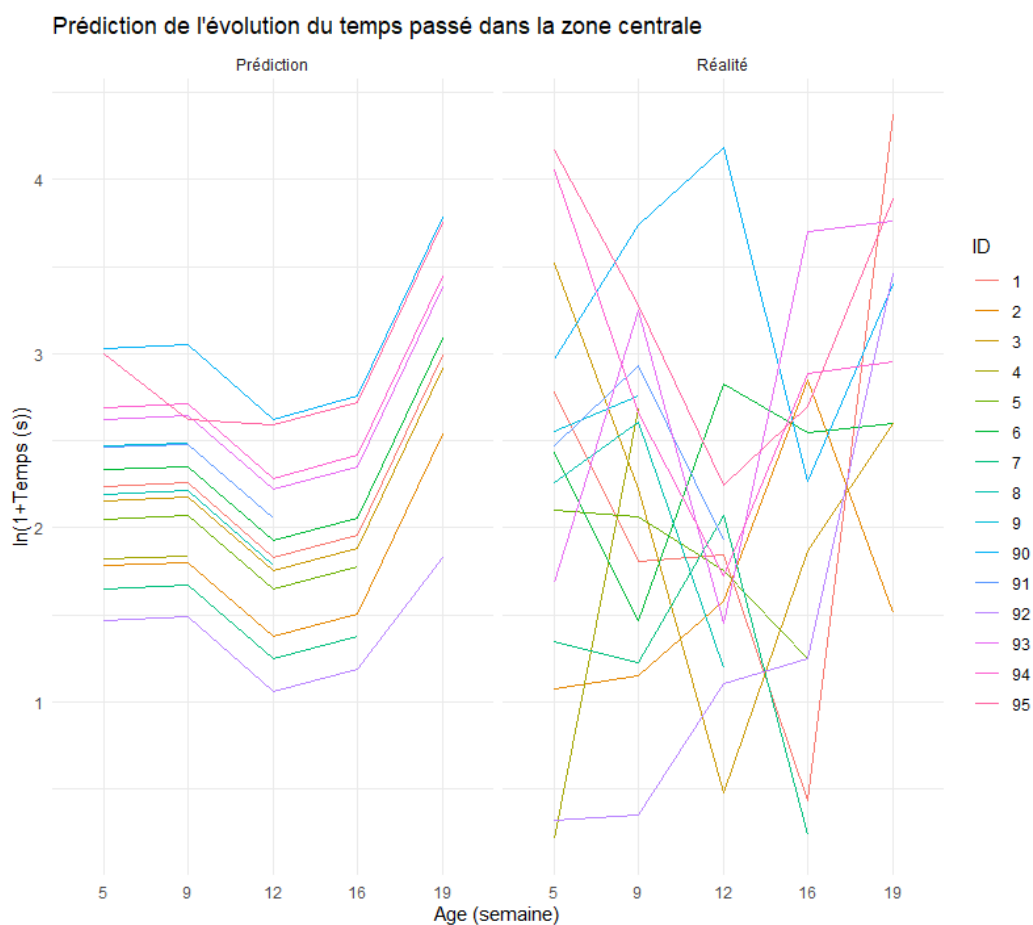


Figure 48 Prédiction, par individu, du temps total passé dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(1+x)$.

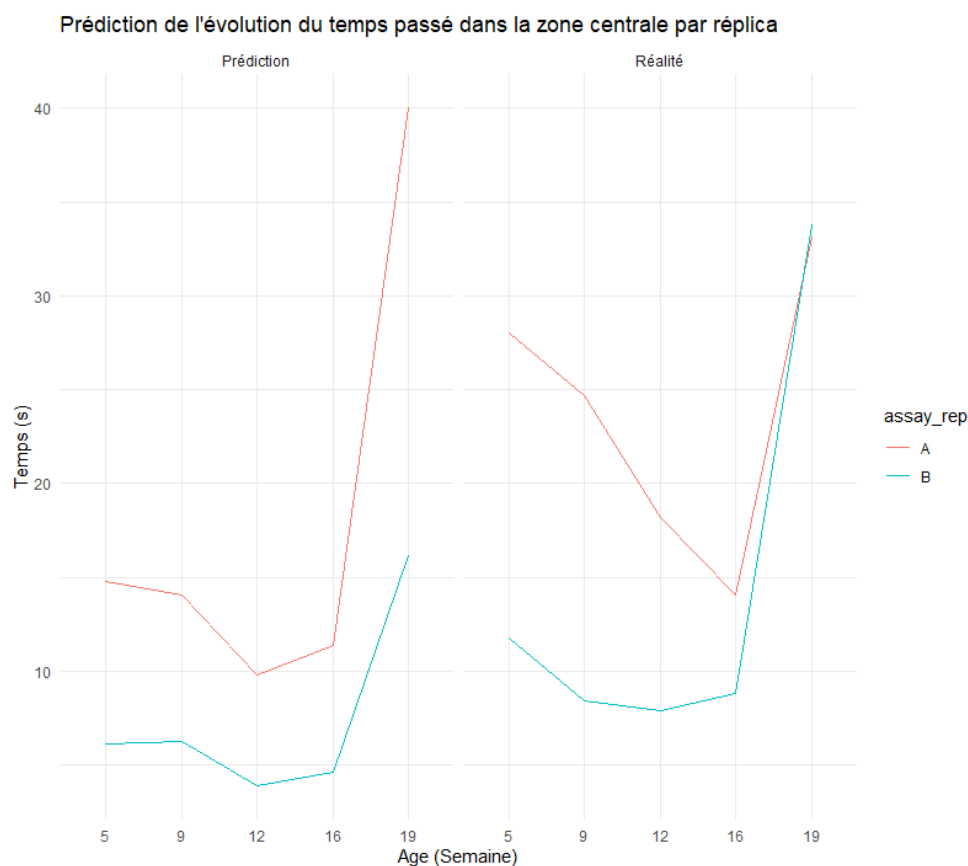


Figure 49 Prédiction, par réplica, du temps total passé dans la zone centrale en fonction de l'âge du poisson

3.2.2. Shelter test

Les variables spécifiques à ce test sont caractéristiques des délimitations et des interactions entre abri et arène.

Latence avant rentrée dans l'arène(s) : Cette variable représente le temps passé avant la première rentrée du poisson dans l'arène.

Pour cette variable, un modèle expliqué par l'âge du poisson a pu être réalisé mais aucun effet fixe n'a pu être mis en évidence sur l'évolution de la latence ($p = 0.1878$). De par les prédictions du modèle réalisé, les individus mettent en moyenne, respectivement pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines, 100, 70, 37, 64 et 55 secondes pour sortir de l'arène. Même si elle n'est pas significative, il convient de noter qu'à l'âge de 12 semaines une diminution marquée de la latence est observée. L'effet individuel est représenté par une répétabilité significative du test de 13.8 % entre individus. Aucune différence entre réplicas n'a pu être mise en évidence, le modèle rejetant l'éventualité d'intégrer ce paramètre dans l'explication de la variable. Les prédictions pour cette variable peuvent être observées en Figure 50 et Figure 51.

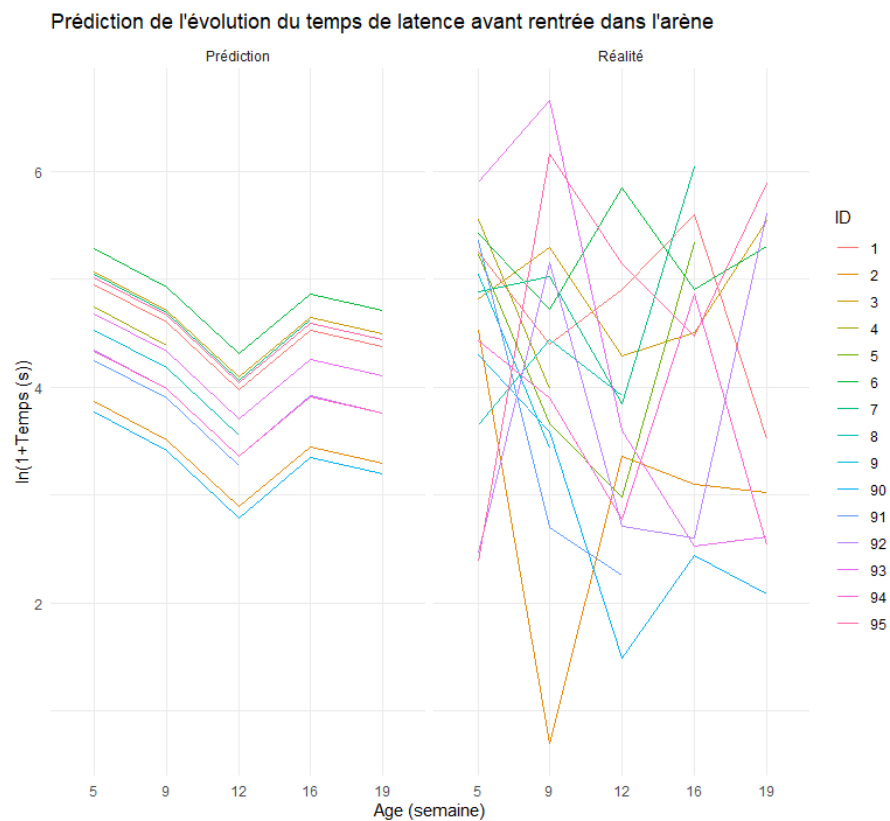


Figure 50 Prédiction, par individu, de la latence avant rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson. .. Les données sont transformées en $\ln(1+x)$.

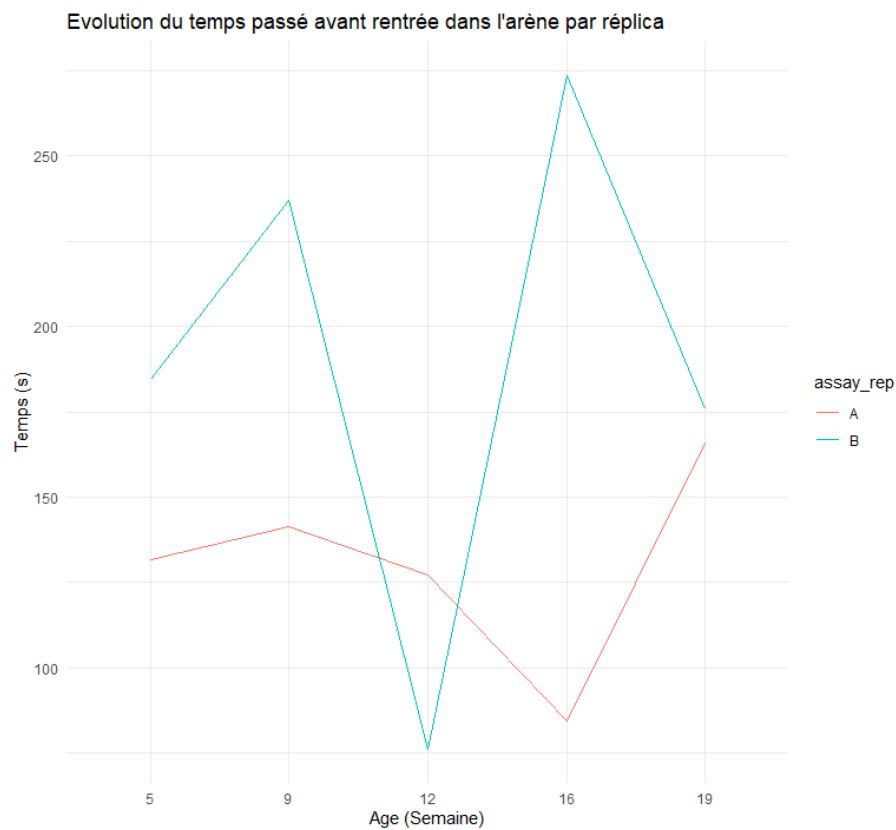


Figure 51 Evolution, par réplica, de la latence avant rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

Fréquence de rentrée dans l'arène : Cette variable est un comptage du nombre de rentrées dans l'arène. Par extension, c'est aussi la fréquence de sortie de l'arène.

Pour cette variable, un modèle incluant les effets fixes de l'âge, du réplica et de la taille a été créé. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (Age : $p = 1.047e-09$, Réplica : $p = 0.001279$, taille : $p = 0.020071$). De par les prédictions du modèle réalisé, les individus rentrent dans l'arène en moyenne et respectivement pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines 13, 8, 5, 4 et 2 fois. Une diminution claire de la fréquence de rentrée s'observe avec le vieillissement du poisson. Après réalisation de contrastes, il semblerait que les moyennes des différents âges sont presque toutes significativement différentes entre elles. Seuls les contrastes entre 5-9 et 12-16 semaines ne sont pas statistiquement significatifs. Une augmentation significative de la fréquence de rentrée est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 5 et 6 rentrées. La répétabilité du test n'a pas pu être calculée car le modèle a été réalisé par glm mais un effet significatif de l'individualité a été mis en évidence. Les prédictions sont observées en Figure 52, Figure 53, Figure 54 et Figure 55.

Temps total passé dans l'arène (s) : Cette variable représente la durée totale de détection du poisson à l'intérieur de l'arène.

Cette variable n'a pas pu être modélisée avec l'âge comme effet fixe. En revanche, elle a pu être modélisée avec le réplica dont l'effet fixe sur l'évolution de la variable est significatif ($p = 0.001706$). Une diminution significative de la durée est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 1213 et 1084 secondes passées dans l'arène. Une répétabilité significative du test de 12.8 % entre individus est observée. Les prédictions sont observées en Figure 56, Figure 57 et Figure 58.

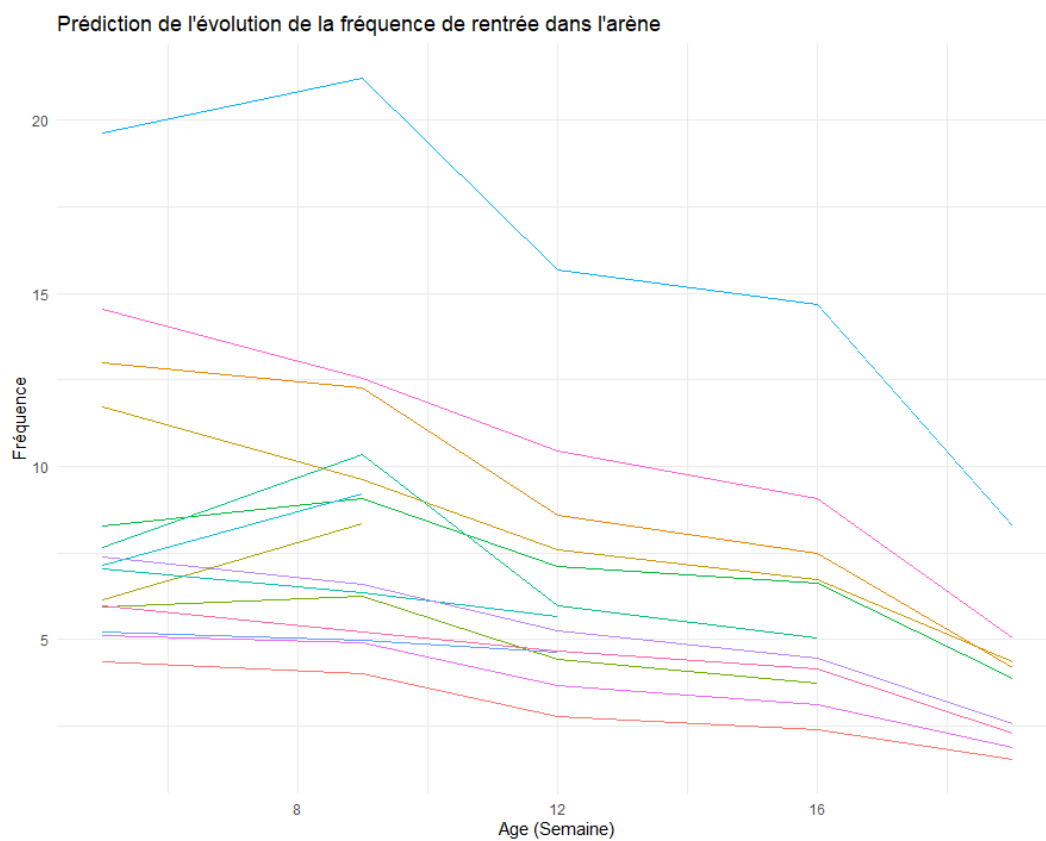


Figure 52 Prédiction, par individu, de la fréquence de rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

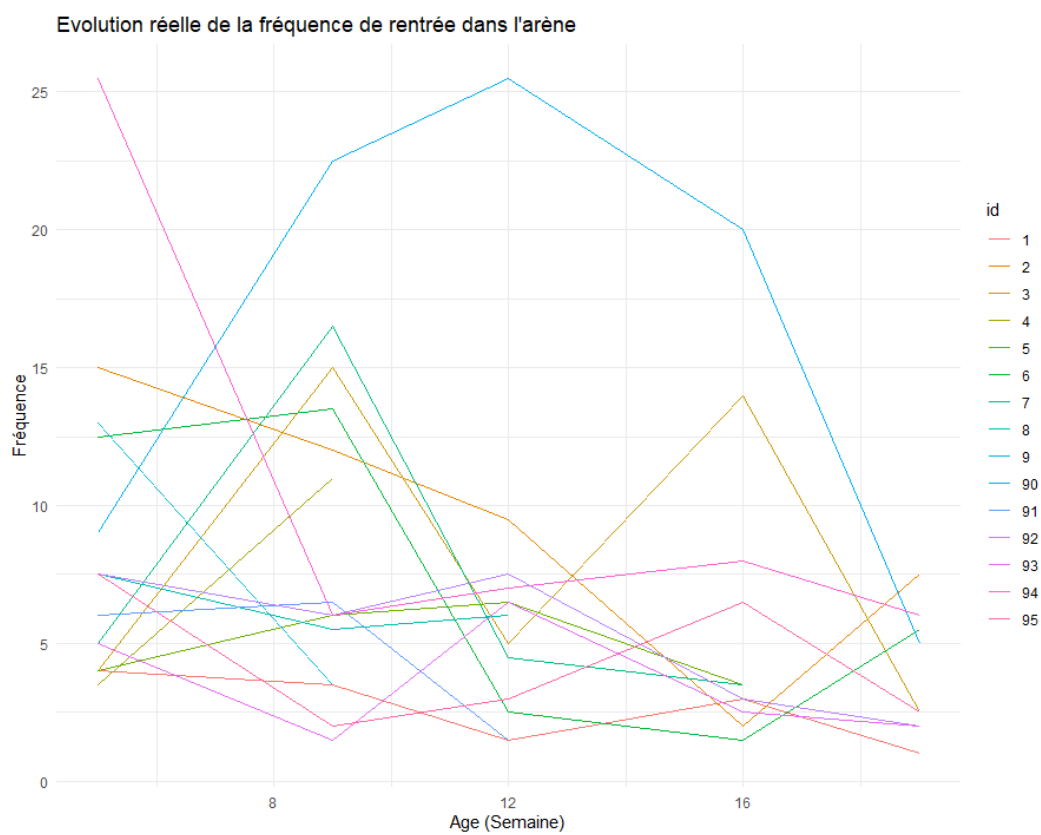


Figure 53 Evolution, par individu, de la fréquence de rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

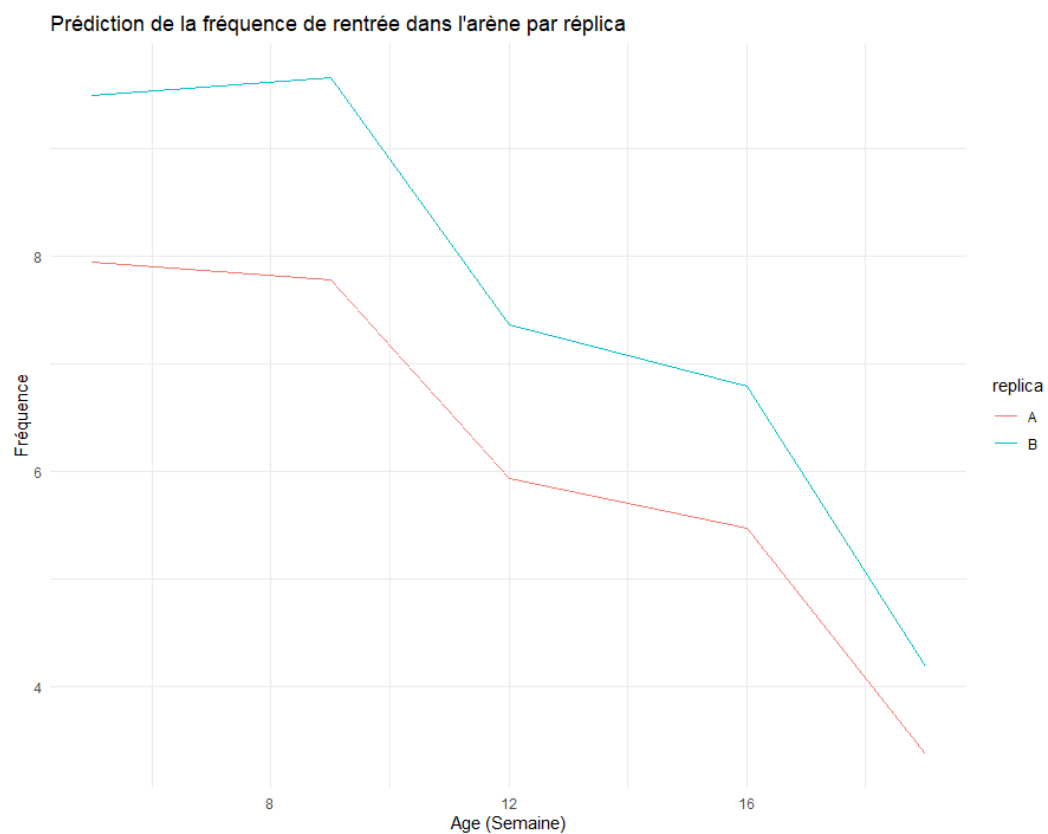


Figure 54 Prédiction, par réplica, de la fréquence de rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

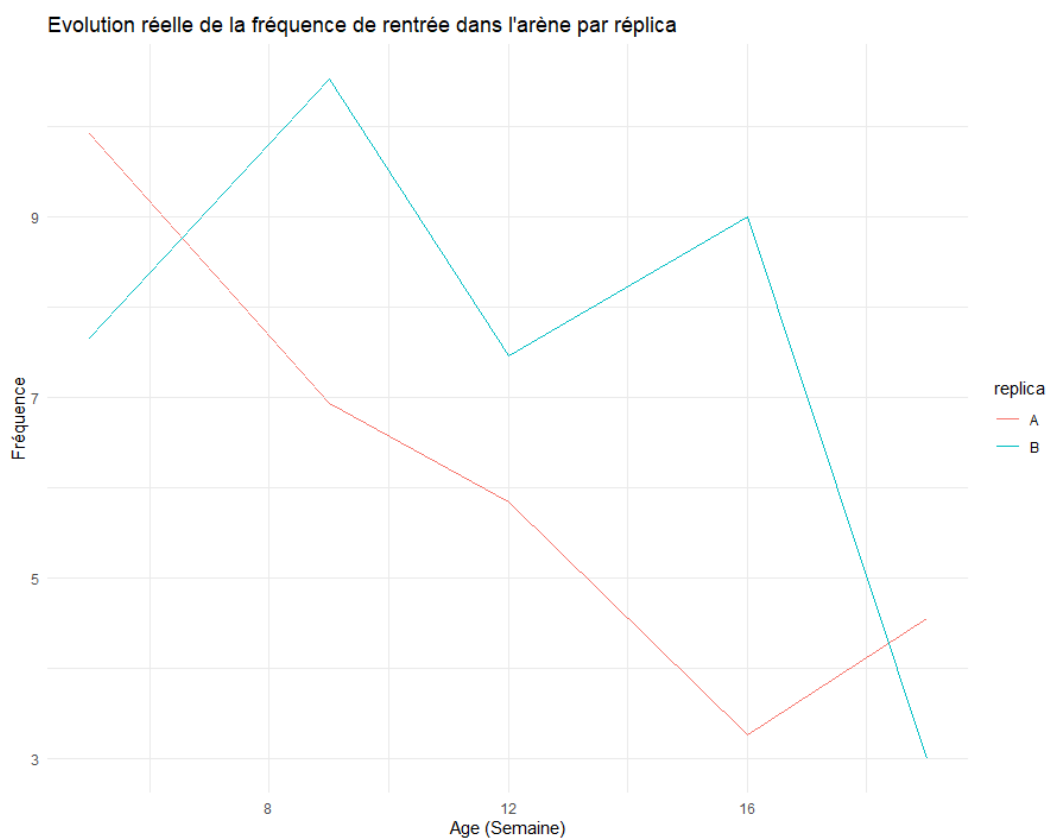


Figure 55 Evolution, par réplica, de la fréquence de rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

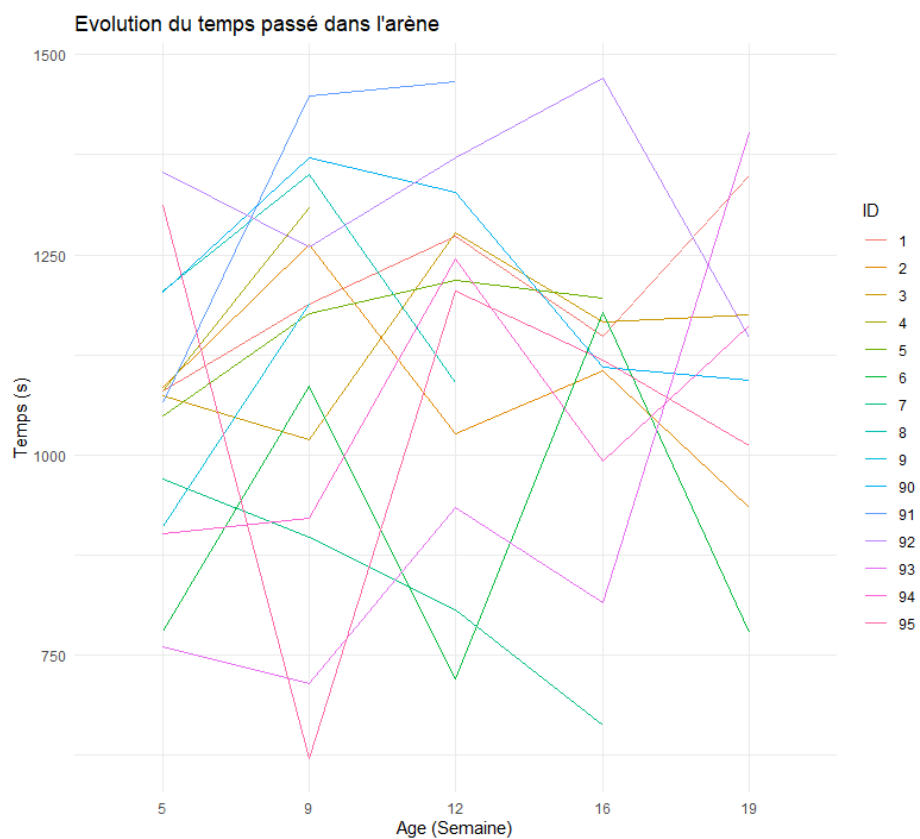


Figure 56 Evolution, par individu, du temps total passé dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

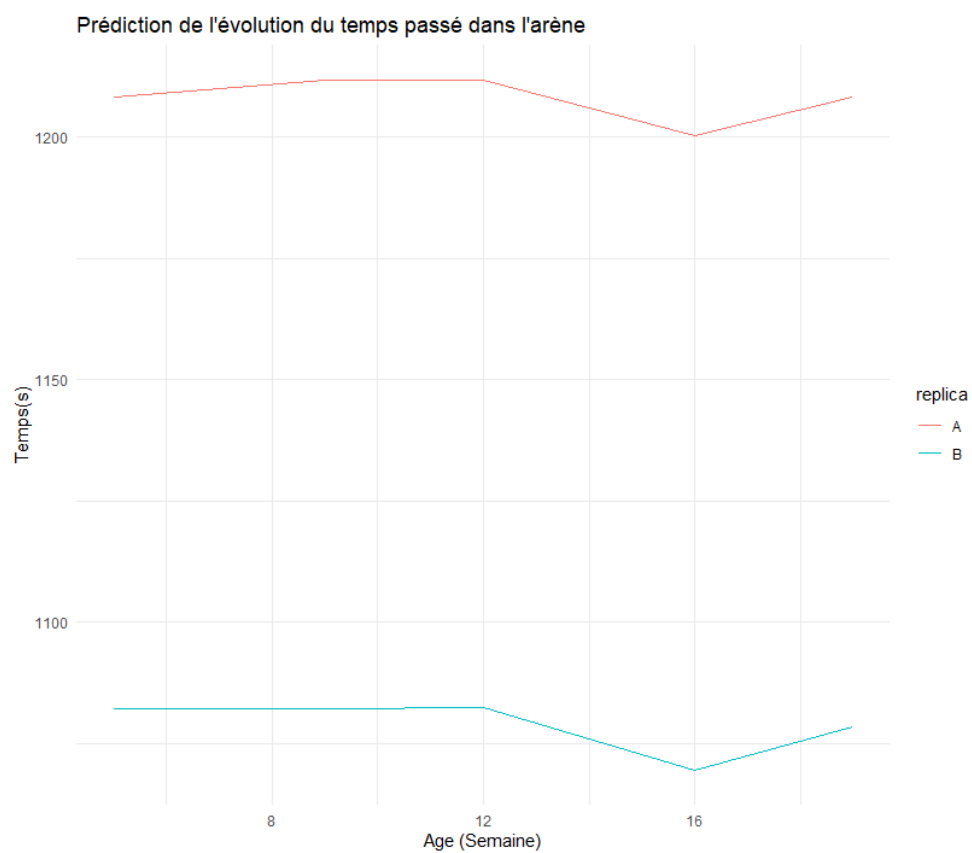


Figure 57 Prédiction, par réplique, du temps total passé dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

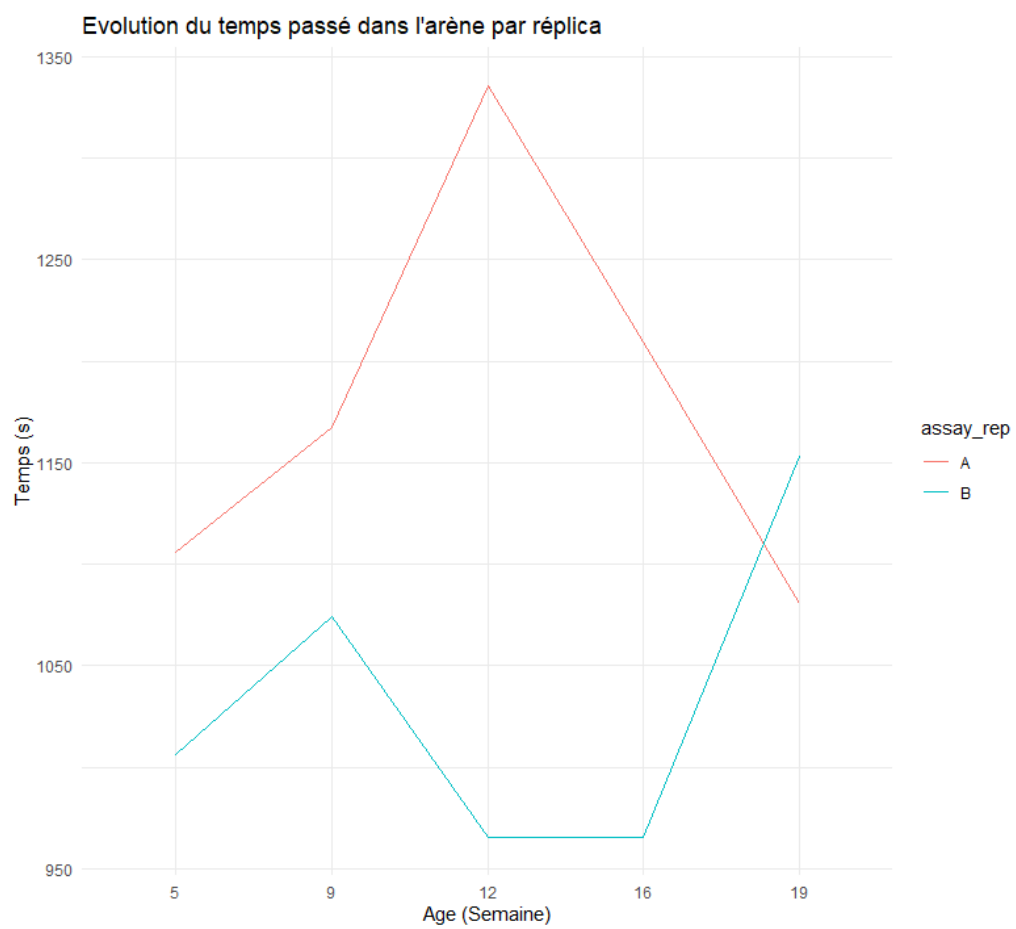


Figure 58 Evolution réelle, par réplica, du temps total passé dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

Temps moyen passé en arène à chaque rentrée (s) : Cette variable représente la durée totale de détection du poisson à l'intérieur de l'arène divisée par la fréquence de rentrée dans l'arène.

Un modèle incluant l'âge et le réplica comme effets fixes a pu être réalisé pour cette variable. Les effets fixes sur l'évolution de la variable sont significatifs (âge : $p=0.0003887$, réplica : $p=0.0214663$). Une augmentation nette du temps moyen par rentrée dans l'arène est observée avec des moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines de 145, 176, 235, 284 et 446 secondes. Après réalisation de contrastes, il semblerait que les moyennes des âges de 5 et 9 semaines soient significativement différentes de la moyenne à 19 semaines. Une diminution significative du temps moyen est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 284 et 198 secondes passées par rentrée dans l'arène. Une répétabilité significative du test de 18.7 % entre individus est observée. Les prédictions sont observées en Figure 59 et Figure 60.

Distance moyenne parcourue en arène à chaque rentrée (cm) : Cette variable représente la distance totale parcourue par le poisson à l'intérieur de l'arène divisée par la fréquence de rentrée dans l'arène.

Cette variable a pu être modélisée en étant expliquée par l'âge, le réplica et la conductivité de l'eau dans lequel le test a été réalisé. Les effets fixes sur l'évolution de la variable de l'âge et de la conductivité sont statistiquement significatifs (Age : $p=8.405e-09$, conductivité : $p=0.03001$) tandis que l'effet du réplica ne l'est pas ($p=0.11081$). Une évolution progressive de la distance est observée en fonction de l'âge avec des moyennes prédites respectives pour les âges de 5, 9, 12, 16 et 19 semaines de 93, 290, 235, 607 et 545 cm. Après réalisation de contrastes, il semblerait que la moyenne à 5 semaines soit significativement plus petite que toutes les autres moyennes. Il semblerait également que l'augmentation de la distance parcourue entre 9 et 16 semaines soit significative. Une diminution non significative de la distance est observée entre le premier et le deuxième réplica avec des moyennes prédites respectives de 330 et 255 cm parcourus par rentrée dans l'arène. La répétabilité du test n'a pas pu être évaluée car l'effet individuel sur la divergence de la réponse au test est considéré comme non significatif. Les prédictions sont observables en Figure 61 et Figure 62.

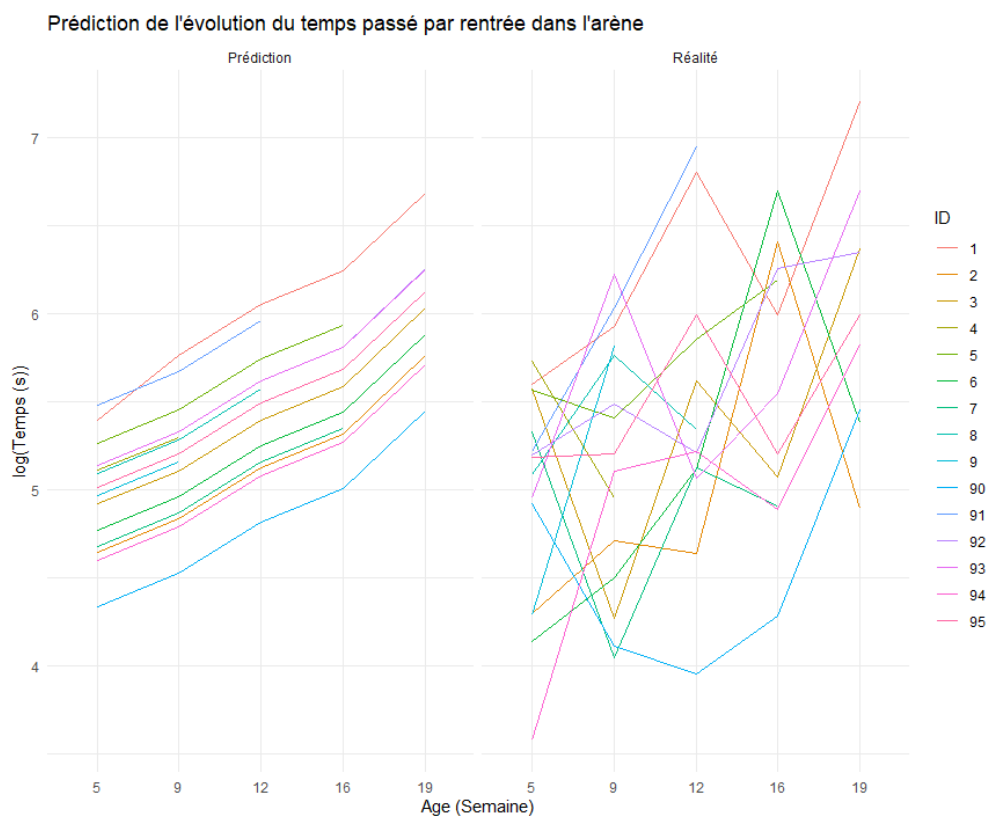


Figure 59 Prédiction, par individu, du temps moyen passé à chaque rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(x)$.

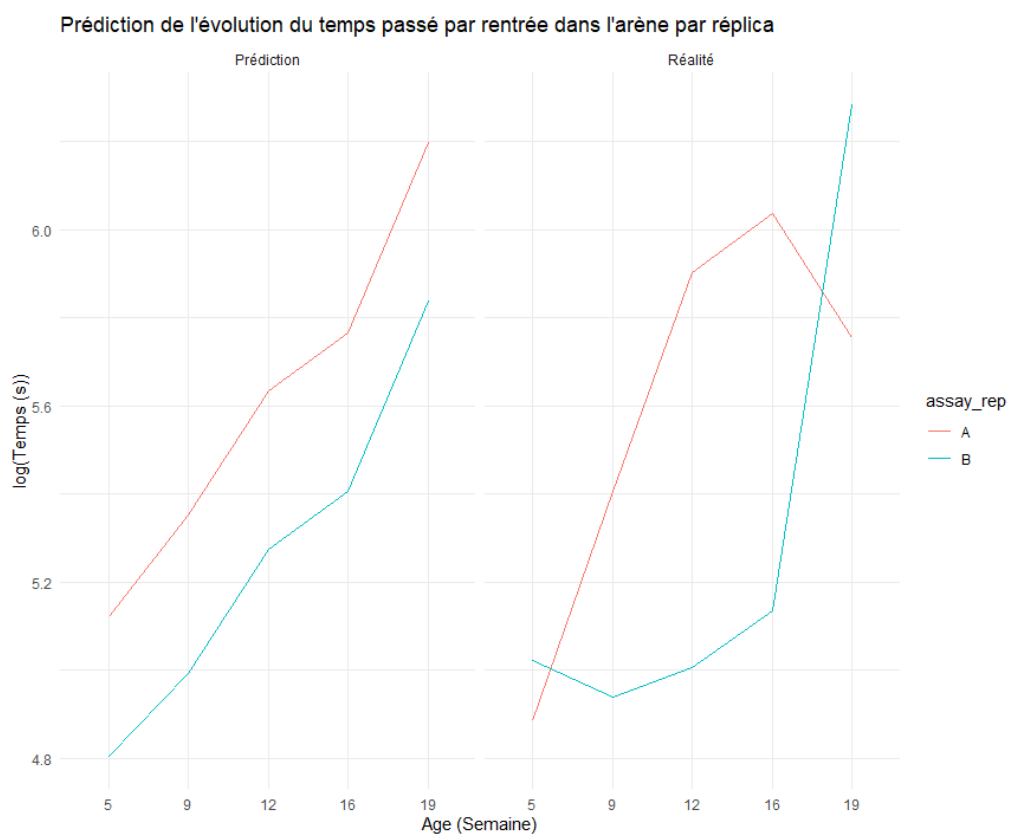


Figure 60 Prédiction, par réplica, du temps moyen passé à chaque rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(x)$.

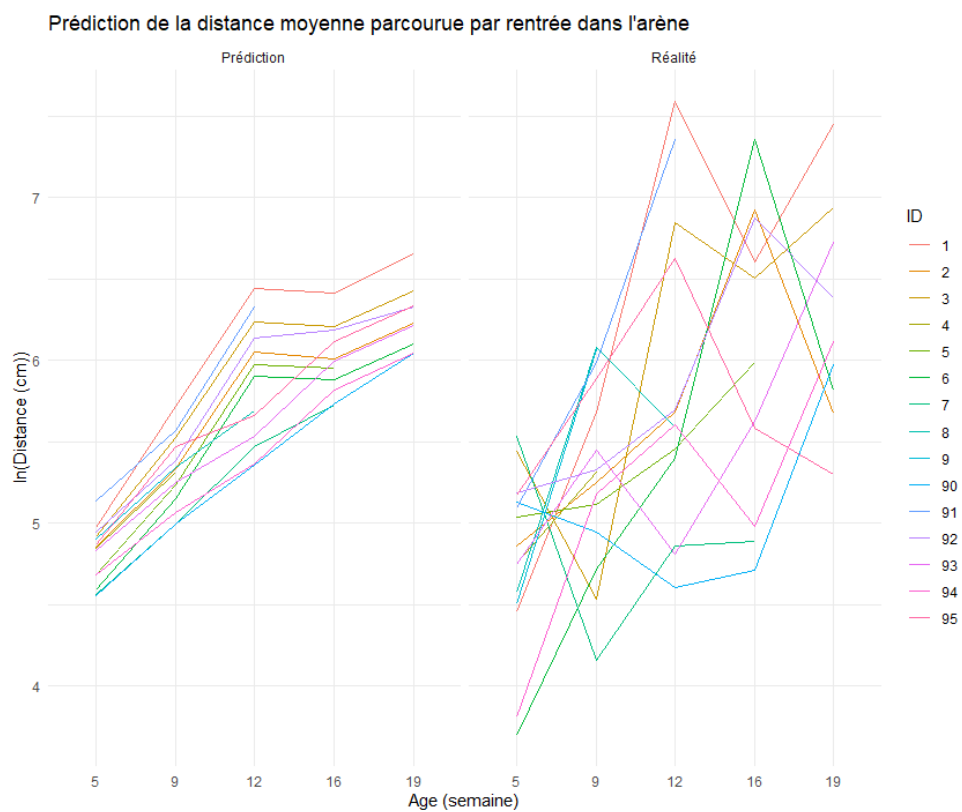


Figure 61 Prédiction, par individu, de la distance moyenne parcourue à chaque rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson. Les données sont transformées en $\ln(x)$.

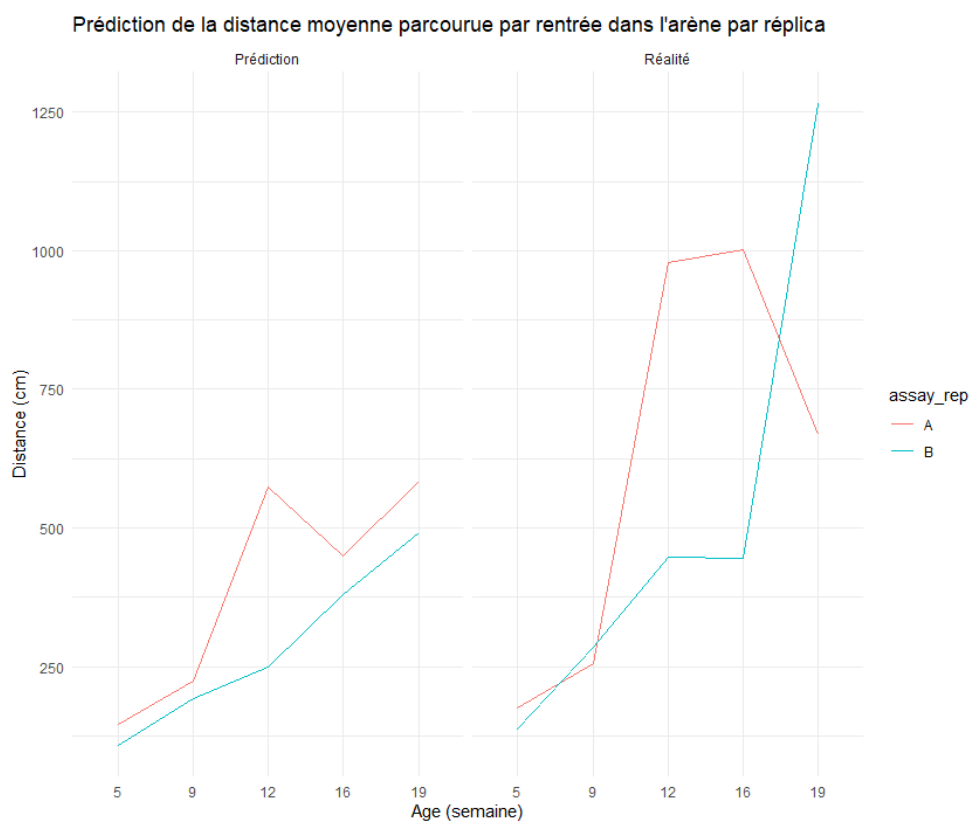


Figure 62 Prédiction, par réplica, de la distance moyenne parcourue à chaque rentrée dans l'arène en fonction de l'âge du poisson

3.3. Résumé des tendances comportementales

Tableau 1 Résumé des tendances d'évolution des variables comportementales

Variable	Test	Tendance avec l'âge	Tendance entre réplicas	Mise en évidence d'un effet individuel
Latence	ST	Diminution progressive non significative	-	Oui, R=13.8
Fréquence de rentrée en arène	ST	Diminution progressive	Augmentation	Oui, R non calculée
Temps passé en arène	ST	-	Diminution	Oui, R=12.8
Temps/fréquence	ST	Augmentation progressive	Diminution	Oui, R=18.7
Temps/fréquence	ST	Deux augmentations fortes à 9 et 16 semaines suivies de paliers	Diminution non significative	Non
Vitesse	ST	Tendance en cloche : Minimas à 5 et 19 semaines, Maxima à 12 semaines	-	Non
Mobilité	ST	Augmentation forte entre 5 et 9 semaines, constance jusqu'à 19 semaines	Augmentation	Non
Pourcentage de temps en mouvement	ST	Augmentation forte entre 5 et 9 semaines, diminution progressive jusqu'à 19 semaines	-	Oui, R=20.8
Fréquence de mise en mouvement	ST	Augmentation entre 5 et 9 semaines, diminution forte jusqu'à 19 semaines	-	Oui, R non calculée
Rotation	ST	Constance entre 5, 12 et 19 semaines, augmentations à 9 et 16 semaines	-	Oui, R non calculée
Latence	OF	Constance de 5 à 16 semaines, diminution forte à 19 semaines	Augmentation	Oui, R=11.2
Fréquence avant rentrée dans la zone centrale	OF	Augmentation de 5 à 9 semaines, constance jusqu'à 16 semaines, augmentation à 19 semaines	Diminution	Oui, R non calculée
Temps passé en zone	OF	Constance de 5 à 16 semaines, augmentation à 19 semaines	Diminution	Oui, R=22.5
Vitesse	OF	Constance entre 5 et 9 semaines, augmentation à 12 semaines, constance jusqu'à 19 semaines	Augmentation	Oui, R=37.6
Mobilité	OF	Augmentation forte entre 5 et 9 semaines, constance jusqu'à 19 semaines	-	Non
Pourcentage de temps en mouvement	OF	Augmentation progressive	Augmentation	Oui, R=24.9
Fréquence de rotation	OF	Constance entre 5 et 9 semaines, diminution forte à 12 semaines, constance jusqu'à 16 semaines, diminution forte à 19 semaines	Augmentation	Oui, R non calculée

4. Caractérisation épigénétique

4.1. Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêt

Six gènes d'intérêts ont été analysés et leurs îlots CpG ont été cartographiés. Les résultats sont disponibles en Tableau 2 et Tableau 3.

Tableau 2 Cartographie des îlots CpG des gènes étudiés en pyroséquençage

Gène	Localisation	Nombre d'îlots CpG
GFAP	Intron 4	1
	Intron 5-Exon 6	1
	3'UTR	2
TET2	Promoteur	1
	5'UTR	1
	Intron 1	7
	Intron 7	3
SIRT1	Exon 9	2
	5'UTR-Exon1-Intron 1	1
	Intron 1	1
	Intron 6	2
	Exon 8	2
NFE2l2a	Intron 8-Exon 9	1
	Promoteur	1
	Promoteur-5'UTR	1
	5'UTR	2
	Intron 1	1
	Exon 2	2
	3'UTR	2

Tableau 3 Cartographie des îlots CpG de deux gènes impliqués dans le vieillissement

<i>Gène</i>	<i>Localisation</i>	<i>Nombre d'îlots Cpg</i>
<i>IGF2</i>	Promoteur	2
	Intron 1	2
	Exon 2	1
	Intron 2	3
	3'UTR	2
<i>GRIA2a</i>	Promoteur	2
	5'UTR	1
	Intron 1-Exon 2	1
	Intron 3	5
	Intron 7	1
	Intron 10	1
	Intron 12	2
	Intron 13	4
	Exon 14	1
	Intron 14	4
	Intron 14- Exon 15	1
	Intron 15	6

4.2. Méthylations des gènes d'intérêts

Pour la séquence du promoteur de GFAP, deux CpG ont pu être analysés efficacement. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 45.7 et 46.7 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 46.0 et 47.5 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Le premier CpG est en moyenne hyper-méthylé tandis que le deuxième est en moyenne hypo-méthylé. Aucun changement significatif entre les différentes conditions n'a pu être mis en évidence. En plus de ces deux bases nucléotidiques, une troisième Cytosine, non associée à une Guanine, a été détectée comme méthylée. Aucun pourcentage de méthylation précis n'a pu être analysé pour cette base mais elle avoisine approximativement les 90% de méthylation, toutes conditions confondues. Les pourcentages sont visualisables en Figure 63 et Figure 64.

Toutes les figures présentées dans cette section présentent des boîtes à moustaches dont les barres horizontales noires représentent les médianes et dont les limites supérieures et inférieures représentent respectivement les 25èmes et 75èmes percentiles des données. Les barres d'erreur représentent les valeurs extrêmes de méthylation ou l'espace interquartile multiplié par 1,5 si les valeurs extrêmes dépassent ce seuil. Dans ce cas, les valeurs extrêmes sont présentées sous forme de points externes considérés comme outliners.

Pour la séquence de l'îlot CpG de la séquence 5'UTR de TET2, 8 CpG ont pu être analysés efficacement. La séquence analysée est hypo-méthylée. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 3.1 et 3.9 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 2.9 et 4.6 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Une différence significative de méthylation a été observée entre les deux organes ($p = 1.286e-05$). Après réalisation de contrastes, il semblerait que la méthylation du foie à 9 semaines soit significativement plus grande que les méthylations des cerveaux à 5 et 9 semaines. Les pourcentages sont visualisables en Figure 65 et Figure 66.

Pour la séquence du troisième îlot CpG du septième intron de TET2, 11 CpG ont pu être analysés efficacement. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 80.7 et 82.7 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 81.3 et 83.1 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Aucun changement significatif entre les différentes conditions n'a pu être mis en évidence. Les pourcentages sont visualisables en Figure 67 et Figure 68.

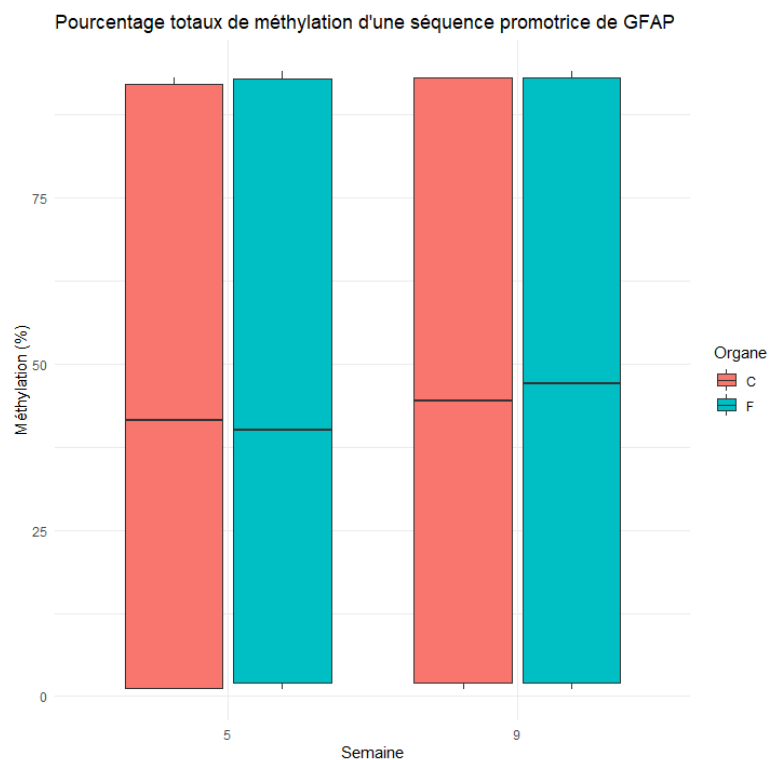


Figure 63 Pourcentages de méthylation de la séquence du promoteur de GFAP. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

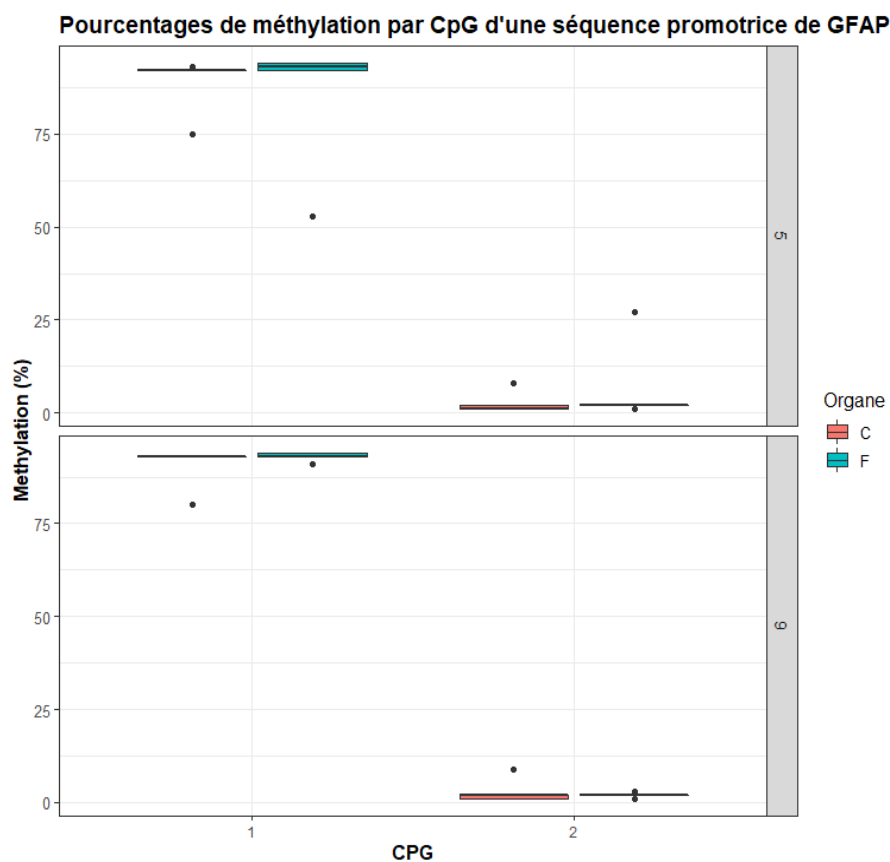


Figure 64 Pourcentages de méthylation par CpG de la séquence du promoteur de GFAP. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

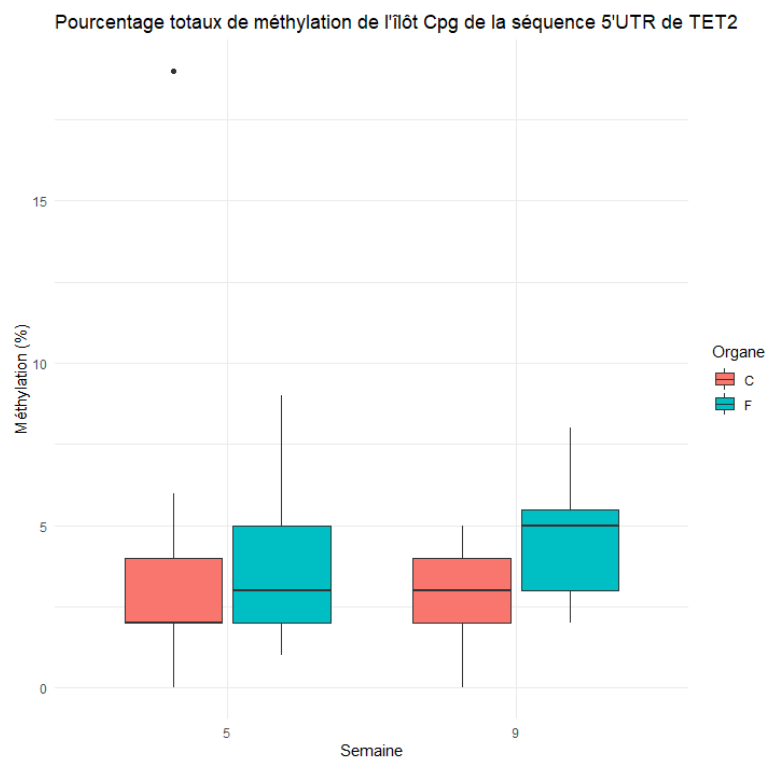


Figure 65 Pourcentages de méthylation de l'îlot CpG de la séquence 5'UTR de TET2. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

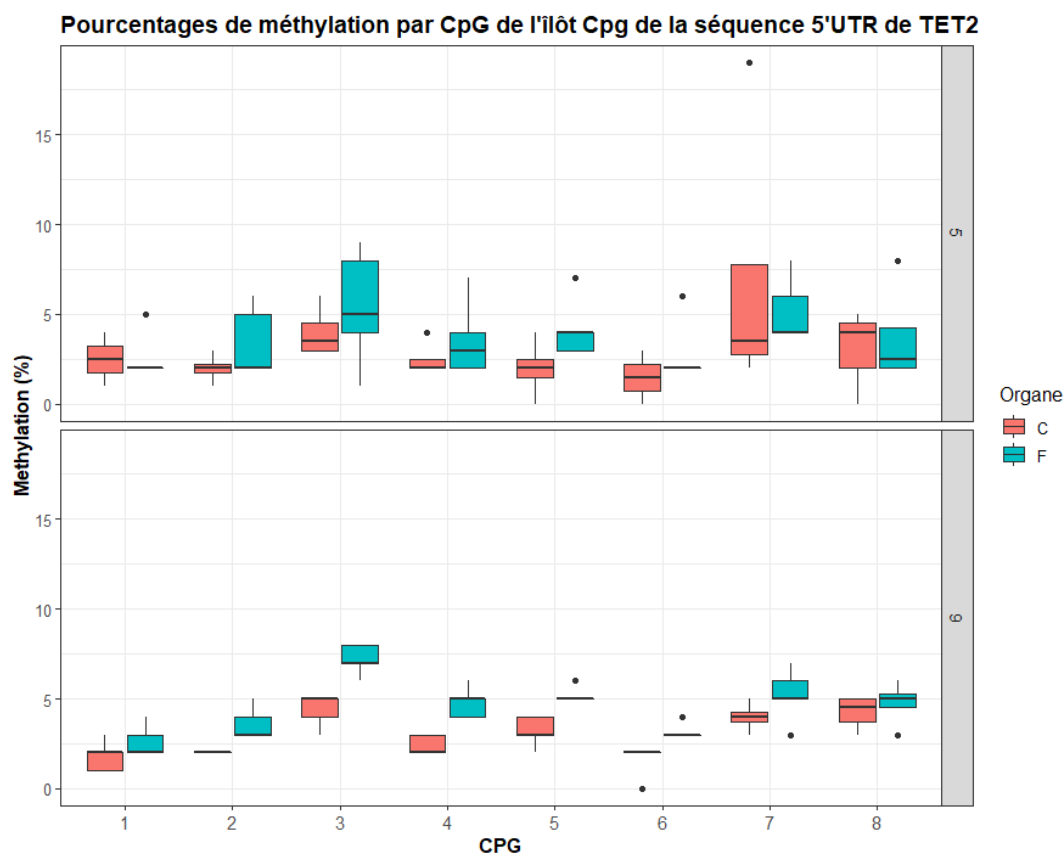


Figure 66 Pourcentages de méthylation par CpG de l'îlot CpG de la séquence 5'UTR de TET2. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

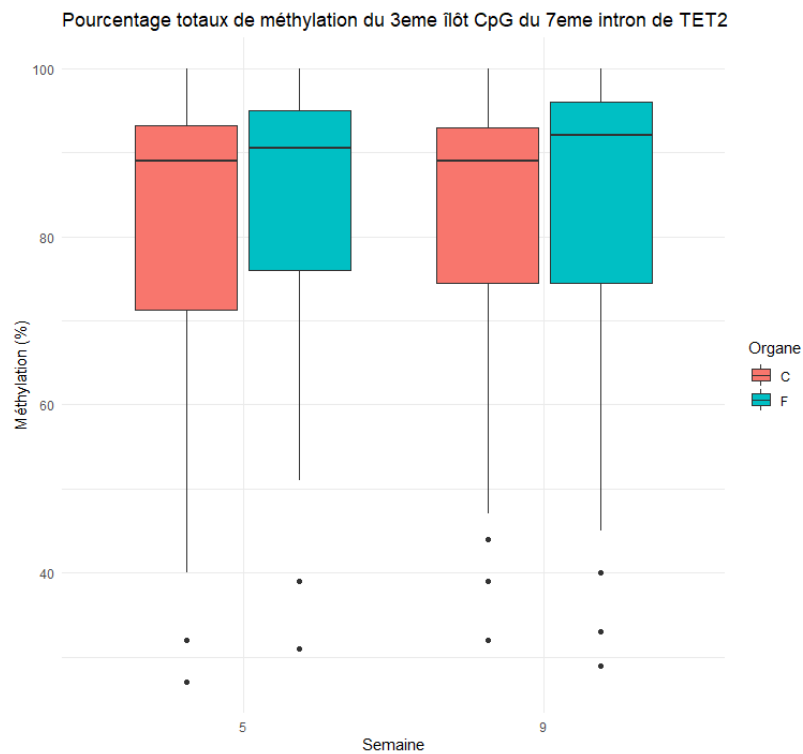


Figure 67 Pourcentages de méthylation du troisième îlot CpG du septième intron de TET2. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

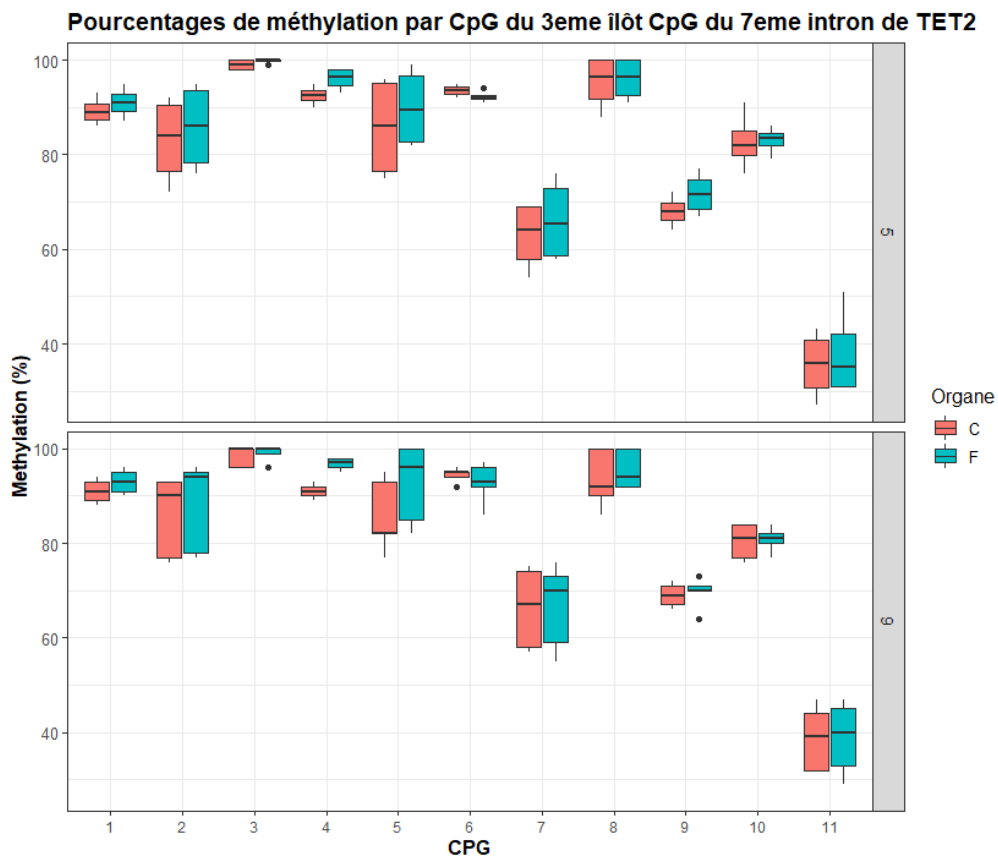


Figure 68 Pourcentages de méthylation par CpG du troisième îlot CpG du septième intron de TET2. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

Pour la séquence de l'îlot CpG du premier intron de SIRT1, 11 CpG ont pu être analysés efficacement. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 83.7 et 86.3% respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 74.9 et 85.1% respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Une différence significative de méthylation a été observée entre les deux organes ($p= 0.01$). Après réalisation de contrastes, il semblerait que la méthylation de la séquence dans le cerveau à 9 semaines soit significativement plus petite que les méthylations des séquences dans les foies à 5 et 9 semaines. Les pourcentages sont visualisables en Figure 69 et Figure 70.

Pour la séquence du premier îlot CpG du sixième intron de SIRT1, 18 CpG ont pu être analysés efficacement. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 48.7 et 49.5 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 51.1 et 49.4 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Aucun changement significatif entre les différentes conditions n'a pu être mis en évidence. Les pourcentages sont visualisables en Figure 71 et Figure 72.

Pour la séquence de l'îlot CpG du promoteur de NFE2l2a, 11 CpG ont pu être analysés efficacement. Les pourcentages totaux de méthylation de la séquence sont de 2.2 et 1.6 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 5 semaines et de 2.5 et 1.3 % respectivement pour le cerveau et le foie à l'âge de 9 semaines. Aucun changement significatif entre les différentes conditions n'a pu être mis en évidence. Les pourcentages sont visualisables en Figure 73 et Figure 74.

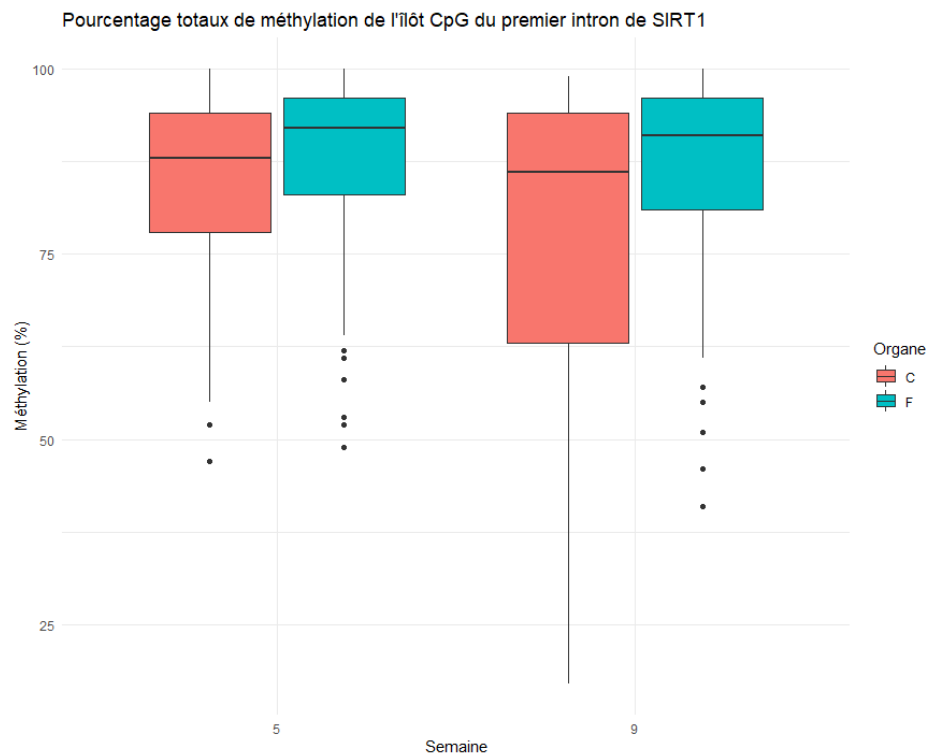


Figure 69 Pourcentages de méthylation de l'îlot CpG du premier intron de SIRT1. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

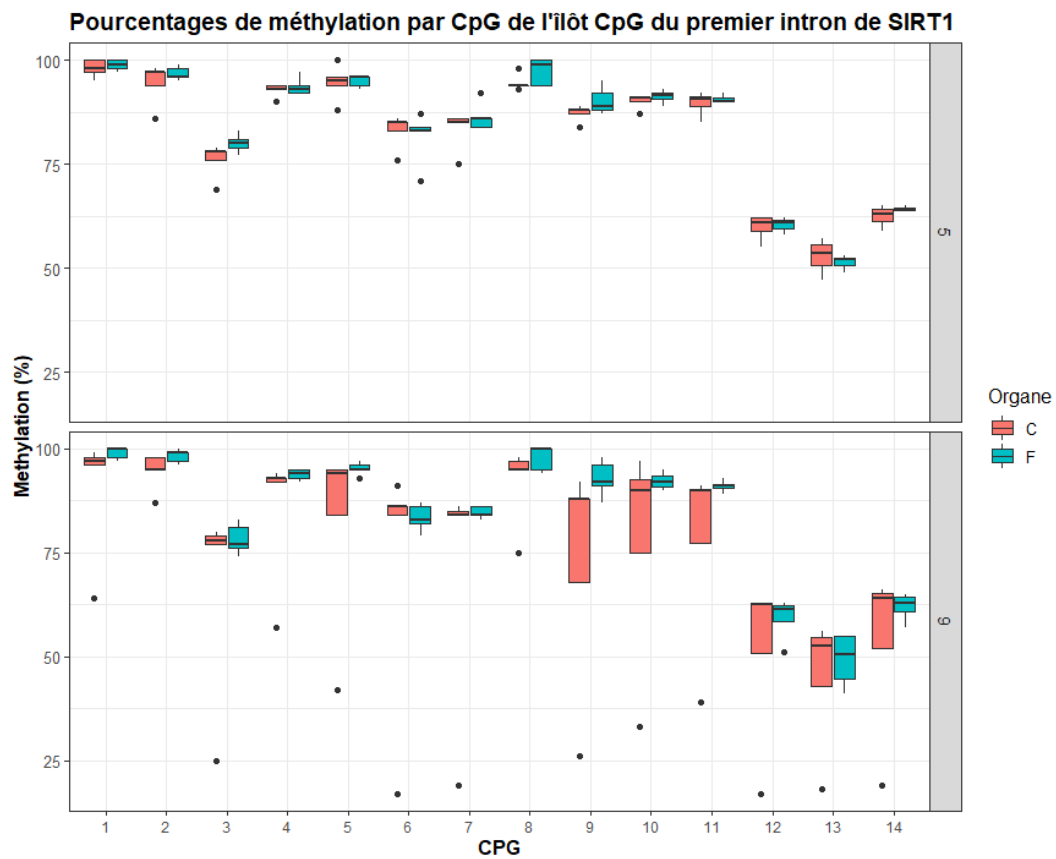


Figure 70 Pourcentages de méthylation par CpG de l'îlot CpG du premier intron de SIRT1. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

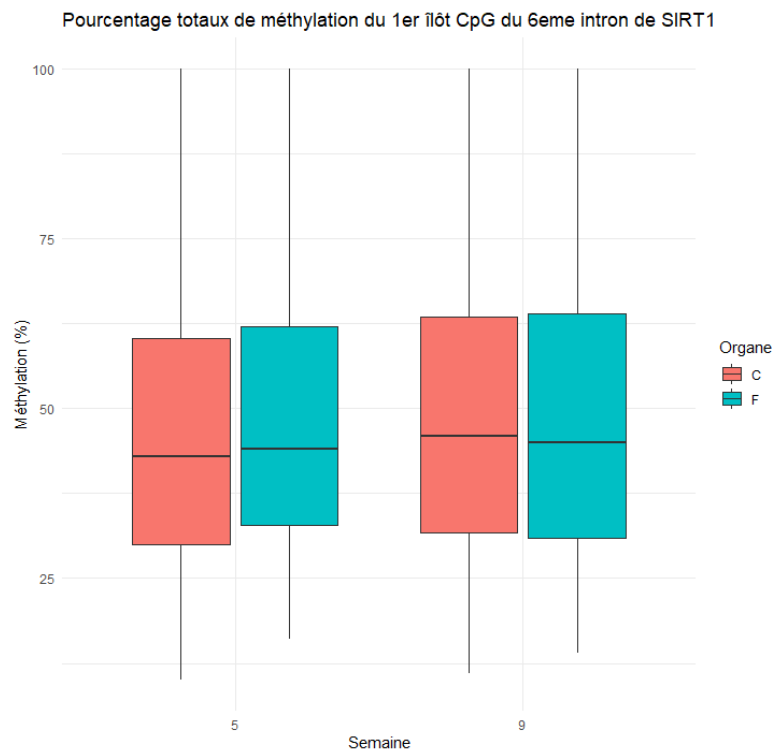


Figure 71 Pourcentages de méthylation du premier îlot CpG du sixième intron de SIRT1. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

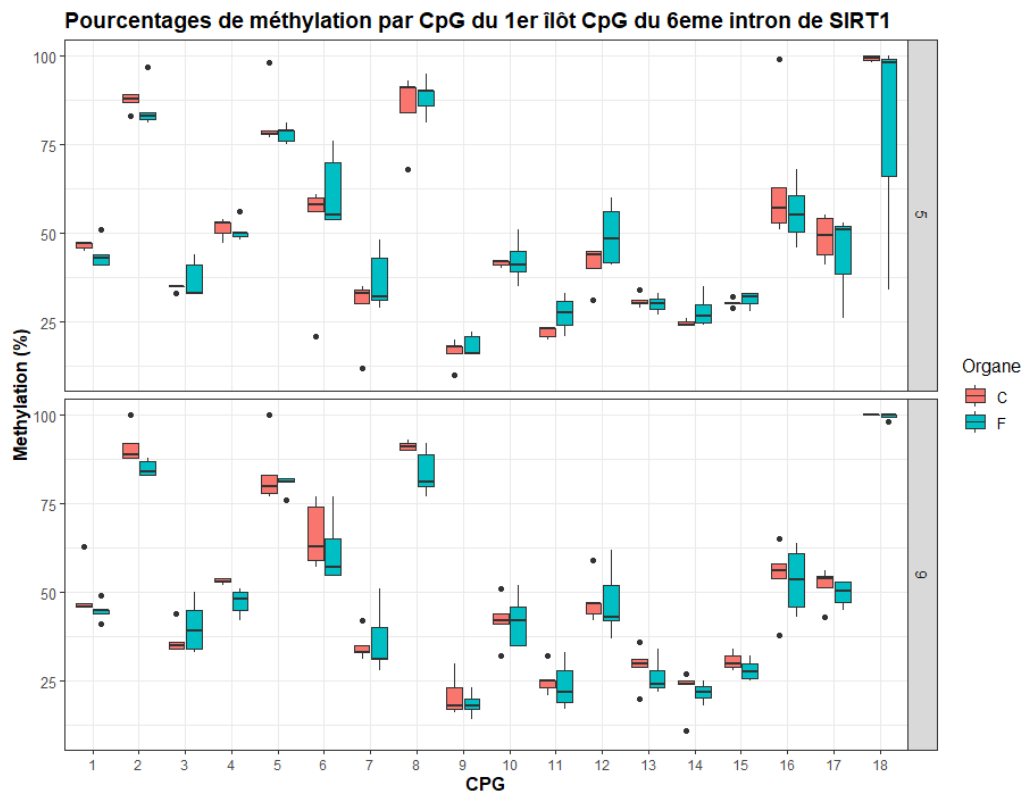


Figure 72 Pourcentages de méthylation par CpG du premier îlot CpG du sixième intron de SIRT1. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

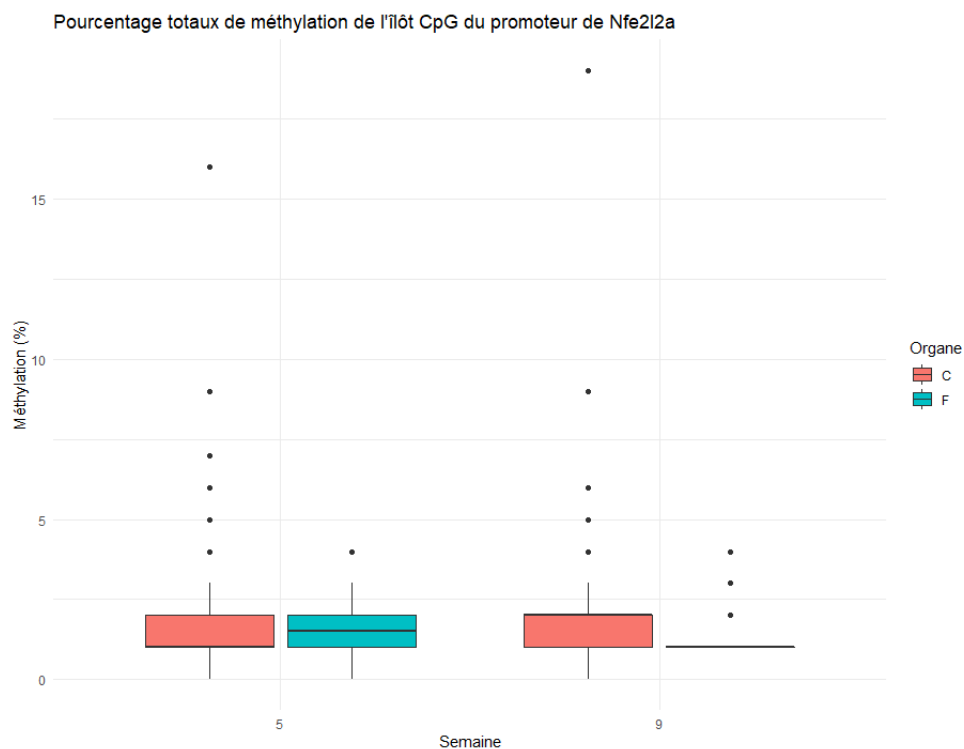


Figure 73 Pourcentages de méthylation de l'îlot CpG du promoteur de NFE2l2a. L'axe x représente l'âge de l'individu étudié et la couleur de la boîte représente l'organe étudié.

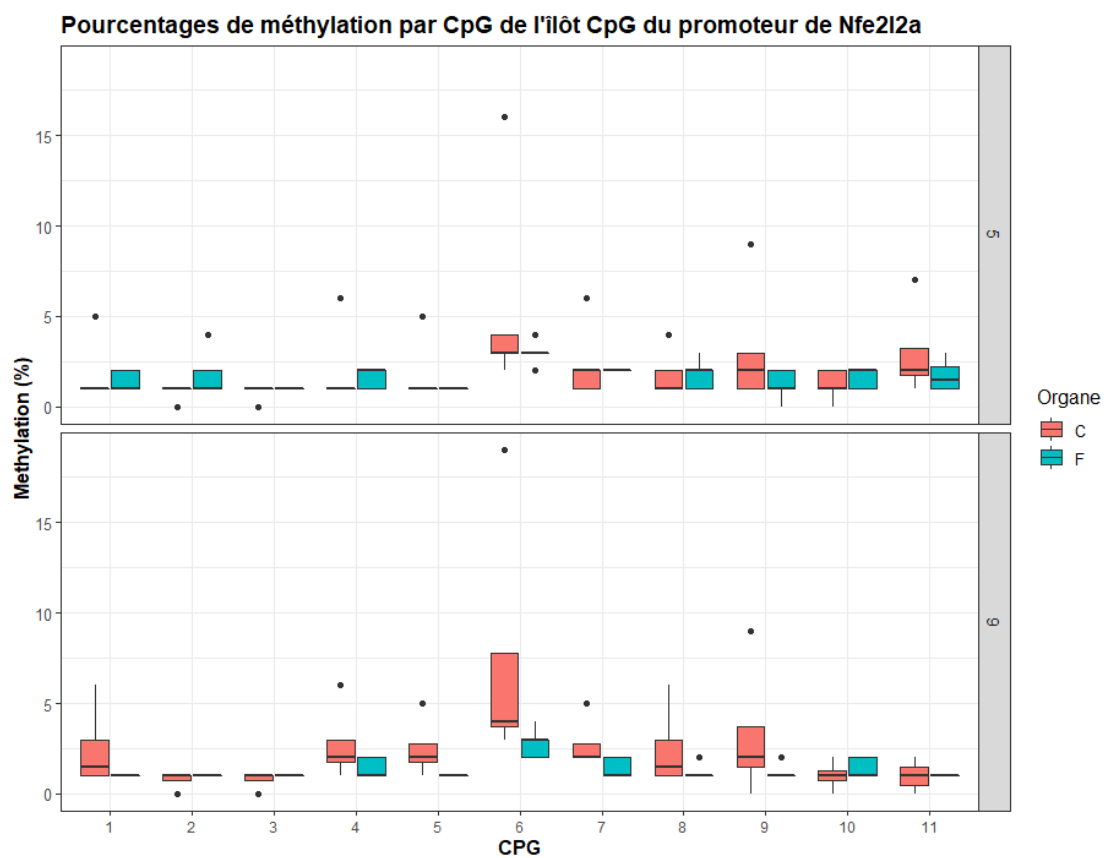


Figure 74 Pourcentages de méthylation par CpG de l'îlot CpG du promoteur de NFE2l2a. L'axe x représente le CpG et la couleur de la boîte représente l'organe étudié. La facette supérieure représente les individus âgés de 5 semaines et celle du dessous les individus âgés de 9 semaines

Discussion

Grâce à son cycle de vie court, *Nothobranchius furzeri* est une espèce idéale pour étudier et comprendre le vieillissement. Cette étude a pour but d'établir deux référentiels distincts du vieillissement de ce modèle dans nos laboratoires. Le premier est un référentiel phénotypique et a été établi par l'étude répétée de 15 individus mâles à cinq stades de vie différents. Ce référentiel comporte des variables comportementales, morphologiques et de mortalité. Le deuxième est un référentiel épigénétique, établi sur deux organes de 10 individus mâles, 5 âgés de 5 semaines post-éclosion (wph) et 5 âgés de 9 wph. Ce référentiel comporte les valeurs de méthylation de bases nucléotidiques CpG de six séquences géniques potentiellement impliquées dans le processus de vieillissement.

1. Taux de survie

La première caractérisation empirique de la longueur du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* a été réalisée en 2003 dans un article de Valdesalici et Cellerino dans lequel les auteurs définissent l'espérance de vie maximale de la souche GRZ comme étant de 12 semaines (Valdesalici & Cellerino, 2003). Cette publication est considérée comme référence dans le domaine et est citée dans la majorité des articles traitants de *Nothobranchius furzeri*. Cependant, dans le cadre de cette étude, les résultats montrent que les individus vivent en moyenne 20 semaines. Cette différence de moyennes pourrait refléter une augmentation de l'espérance de vie de la souche GRZ entre 2003 et 2019. Les individus GRZ descendent tous de la même population prélevée dans les années 70. Pour cette lignée, la dessiccation annuelle des mares temporaires, la force de sélection principale de leur environnement d'origine, a disparu dès la deuxième génération élevée en laboratoire. De plus, la vie en conditions de laboratoire en association avec un brassage génétique très faible augmente le taux d'homozygotie de la souche de génération en génération (Platzer & Englert, 2016). Ces conditions peuvent avoir progressivement favorisé la sélection d'individus vivant plus longtemps, phénomène visible entre 2003 et 2019 grâce au nombre élevé de générations s'étant développées durant ce laps de temps. Cette sélection peut être expliquée en considérant le vieillissement comme le résultat de compromis énergétiques (Kirkwood *et al.*, 1991; Lemaître *et al.*, 2015). En milieu naturel, les individus se développant et se reproduisant le plus rapidement possible avant la disparition de leur environnement maximisent leurs chances d'assurer leur descendance (Cellerino *et al.*, 2016). Cette reproduction est très énergivore et en supposant que les allocations énergétiques dédiées aux activités telles que la recherche de nourriture ou encore la compétition restent

constantes, l'allocation dédiée à la maintenance basique diminue drastiquement ce qui mènerait à un développement rapide du vieillissement (Kirkwood *et al.*, 1991; Lemaître *et al.*, 2015). Puisque les forces de sélections se sont différenciées en laboratoire, la nécessité de se reproduire de cette façon a disparu. Ce fait peut avoir engendré une diminution progressive de l'allocation énergétique à la reproduction et donc une augmentation de l'allocation à la maintenance basique, ce qui retarderait le vieillissement.

Si la reproduction peut influencer le développement du vieillissement par le biais d'allocations énergétiques, d'autres processus le pourraient également. Une hypothèse d'influence d'un de ces processus sur le vieillissement peut être élaborée en notant une différence de design expérimental entre ce mémoire et l'article de Valdesalici et Cellerino. Dans leur étude, les individus étudiés vivent en bassins communautaires tandis que dans ce mémoire, les individus vivent dans des bassins individuels dès maturité sexuelle ce qui pourrait expliquer une partie de la différence entre les deux espérances de vie. De par une absence totale d'interactions entre congénères et l'apport constant de sources énergétiques en laboratoire, les mâles vivant seuls n'ont pas dépensé d'énergie pour de nombreuses activités normalement réalisées, comme l'agression entre mâles, caractéristique de cette espèce (Reichard *et al.*, 2009). Cette énergie pourrait donc être allouée à la maintenance basique de l'organisme et cela pourrait retarder son vieillissement si on le considère comme le résultat d'allocations trop faibles à la maintenance basique. Il est donc acceptable de se demander si les interactions sociales n'influencent pas le développement du vieillissement.

Une autre différence entre design expérimentaux réside dans le fait que seul des individus mâles ont été étudiés dans ce mémoire, tandis que dans l'article de Valdesalici et Cellerino les deux sexes ont été analysés. L'espérance de vie pourrait être différente entre les deux sexes, cependant il a été démontré qu'elles demeurent très proches (Graf *et al.*, 2013).

2. Caractérisation comportementale

2.1. Variabilité inter-individuelle

Une première observation notoire dans le cadre de cette étude comportementale est la diversité de réponses des individus aux tests. Les répétabilités calculées avoisinent en moyenne les 20 pourcents et dans certains cas, cette répétabilité a pu être vérifiée et s'est avérée être statistiquement valable. En d'autres mots, la variance intra individuelle (entre les mesures prises entre chaque individu) n'explique qu'en moyenne 20 pourcents de la variance totale du test. Le reste de la variance peut être expliquée en partie par des différences de réponses inter-individuelles aux tests et en partie par d'autres variables qui n'ont pas pu être analysées dans cette étude (par exemple des conditions abiotiques autres que la température ou la conductivité comme la pression de l'eau du bassin).

Cette variabilité inter-individuelle pourrait représenter une individualité propre à chaque individu. De par cette hypothèse, des études approfondies sur le sujet pourraient mener à une mise en évidence de différences de traits de personnalité entre individus. Chez les animaux, il existe des traits comportementaux qui vont se différencier fortement entre individus. Ces différenciations peuvent être catégorisées par différents termes comme des styles ou des syndromes comportementaux, des personnalités ou encore des tempéraments distincts entre individus (Castanheira *et al.*, 2013; Polverino *et al.*, 2016). Chez les poissons, deux grands types de personnalité ont été définies : la personnalité proactive caractérisée par une attitude audacieuse devant de nouvelles situations ou encore une agressivité face à un danger, et la personnalité réactive caractérisée par des comportements de fuites, de timidité et de non-agressivité (Coppens *et al.*, 2010; Castanheira *et al.*, 2013).

Dans nos résultats, il pourrait être intéressant de s'intéresser au poisson numéro 90. En Shelter test, il possède les valeurs prédites les plus élevées pour la majorité des variables étudiées. Pour l'Open field, c'est le poisson qui possède les valeurs les plus élevées pour les variables spécifiques au test. En revanche, pour la vitesse moyenne, la rotation et le pourcentage de temps passé en mouvement, il fait partie des poissons ayant les prédictions les plus faibles. En d'autres mots, face à un nouvel environnement, le poisson numéro 90 met peu de temps avant de le découvrir et y est très actif, faisant de nombreux aller retours entre abris et arène, s'arrêtant et se mettant plus souvent en mouvement tout en faisant plus de rotations que les autres individus. Dans son aquarium habituel, il est moins actif que les autres poissons et s'éloigne plus rapidement, plus longtemps et plus de fois du bord de l'aquarium. Ce type de comportement

pourrait être associé à une personnalité pro-active. Pour pouvoir confirmer ce dire, d'autres tests comportementaux comme des tests d'agressivité ou de fuite face à un stimulus auraient dû être réalisés, mais ce type d'observation peut suggérer l'existence de personnalités divergentes chez ces poissons presque clonaux (Thoré *et al.*, 2018).

Le terme de personnalité commence cependant à être critiqué dans les études comportementales, car très descriptif et peu intégré dans des contextes évolutifs ou écologiques. La variabilité inter-individuelle comportementale pourrait être vue comme le mécanisme fondateur à l'existence de l'écologie comportementale qui explique le comportement animal d'un point de vue évolutif et fonctionnel. Dans ce cas, la variabilité observée dans cette étude pourrait être vue comme de la plasticité comportementale, mécanisme permettant de s'adapter au mieux à des fluctuations de l'environnement (Thoré *et al.*, 2018).

Que cette variabilité représente un trait de personnalité ou de la plasticité comportementale, l'aspect intégratif de l'écologie comportementale soulève un autre point important dans cette étude. Puisque le killifish turquoise vit dans des environnements à espaces réduits, ce poisson va réaliser de nombreuses interactions avec ses congénères et avec d'autres espèces (Reichard *et al.*, 2009). Des interactions telles que la reproduction ou la compétition pourraient conditionner le comportement des killifish, ce qui pourrait réduire la variabilité comportementale entre individus. Cette hypothèse soulève la possibilité de l'apparition de comportements artéfacts dans ce mémoire, dû à l'absence d'interactions sociales durant la vie des individus testés.

2.2. Variabilité entre répliques

Malgré la variabilité inter-individuelle, plusieurs tendances générales ont pu être relevées après modélisation dans cette caractérisation comportementale. Parmi celles-ci, il est intéressant de remarquer des différences dans les réponses des poissons aux tests comportementaux entre les deux répliques réalisés par tranche d'âge.

2.2.1. Habituation

Une première notion à discuter vis-à-vis des différences comportementales entre répliques réalisés aux mêmes âges est la notion d'habituation. L'habituation est définie comme un processus de diminution de réponse à un stimulus suite à une exposition répétée de ce stimulus (Larsch & Pantoja, 2019). Dans le cas de l'utilisation d'un test avec mise à disposition d'un abri pour fuir un stimulus, l'habituation est définie comme l'utilisation de plus en plus faible de cet abri au cours des répliques (Winandy & Denoël, 2013). Or, dans notre étude, ce n'est pas le cas. La fréquence de rentrée et de sortie de l'abri augmente d'un aller-retour entre le premier et le deuxième réplica, et les poissons passent en moyenne 129 secondes en moins dans l'arène pendant le réplica B. Dans cette étude, *Nothobranchius furzeri* ne semble pas s'habituer au Shelter test entre les deux répliques réalisés sur les mêmes tranches d'âge.

En revanche, les différences de réponses aux tests entre les différentes tranches d'âge pourraient être vues comme de l'habituation plutôt que d'être vues comme un effet de l'âge. Le même test est réalisé et répété dans les mêmes conditions abiotiques tout au long de la vie de l'individu. Cette répétition des mesures peut donc être considérée comme réplica du test. Dans le cas du shelter test, au cours de leur vie, les individus utilisent de moins en moins l'abri. Ces tendances peuvent signifier un effet de l'âge, les individus s'enhardissant en vieillissant (White *et al.*, 2013). Elles peuvent également souligner une habituation au test au cours du temps avec une diminution progressive de la réponse comportementale suite à la reconnaissance des stimuli du test (Winandy & Denoël, 2013). Elles peuvent également souligner un effet synergique entre habituation et effets de l'âge, ce qui soulève l'hypothèse de l'existence d'une forme d'apprentissage au cours de la vie des poissons.

Afin d'essayer de déterminer si cette utilisation moins soutenue de l'abri entre les tranches d'âge tient de l'habituation entre répliques ou d'un effet de l'âge, l'observation des prédictions de l'évolution des variables par répliques au cours de l'âge peut être intéressante. Nos résultats montrent que pour chaque variable, les moyennes prédites par répliques en fonction de l'âge restent bien séparées entre le réplica A et le réplica B. En conséquence, quel que soit l'âge du

poisson il ne semble pas avoir d'habituatation entre le réplica A et le réplica B. Ce résultat nous conforte dans l'idée que nous observons un effet de l'âge plutôt qu'une habituatisation au fil des tests. Pour la suite de cette discussion, l'hypothèse d'une habituatisation au test au cours du temps sera donc négligée. Cependant, il est nécessaire de préciser qu'elle n'est pas rejetée et qu'une étude plus approfondie sur le sujet serait nécessaire pour confirmer l'absence d'habituatisation au test.

2.2.2. Sensibilisation

Lors du deuxième réplica, le poisson semble être plus actif que dans le premier réplica. En Shelter test, sa mobilité y est plus élevée et il fait plus d'aller et retours entre l'abri et l'arène. En Open field, sa vitesse moyenne y est plus grande, il y passe plus de temps en mouvement et y réalise plus de rotations, ce qui pourrait suggérer un comportement de nage erratique. Dans le shelter test, les individus retournent plus souvent dans l'abri et restent moins de temps dans l'arène, dans le cadre de l'Open field, ils semblent éviter plus fortement la zone centrale avec une diminution de la fréquence de rentrée et du temps total passé dans cette zone, ainsi qu'une augmentation du temps de latence avant d'y rentrer. Ces observations pourraient traduire un caractère plus méfiant lors des deuxièmes réplicas. L'augmentation de la mobilité générale du poisson en association avec l'utilisation plus soutenue de l'arène et l'évitement de la zone centrale de l'Open field pourraient être le fruit de l'effet d'une anxiété provoquée par l'enchaînement des manipulations (Blaser *et al.*, 2010; Johnson & Hamilton, 2017).

Si l'anxiété du poisson est bien responsable de ces tendances, le concept de capacité cognitive à retenir un stimulus peut être développé plus en profondeur. Plus haut, l'hypothèse de l'existence d'habituatisation a été développée. Ce concept d'habituatisation fait intervenir une capacité cognitive à retenir un stimulus et de ce fait, la réponse de l'individu diminue au cours de ces interactions avec le stimulus. Le processus inverse de l'habituatisation est la sensibilisation. La réponse comportementale dans ce processus ne diminue pas mais augmente avec les rencontres du stimulus (Pilz & Schnitzler, 1996). Si les killifish turquoise rencontrent trop de stimuli négatifs engendrant de l'anxiété au cours de leur premier réplica, il est possible que lors de la reconnaissance de ces stimuli lors du deuxième réplica leurs réponses comportementales de fuite et de méfiance soient amplifiées (Pilz & Schnitzler, 1996; Blaser *et al.*, 2010). La sensibilisation à un stimulus négatif répété dans un laps de temps court peut être expliquée d'un point de vue écologique. Par exemple, la sensibilisation à des stimuli associés à un risque de prédation ou à un risque de blessure augmente sensiblement la probabilité de survie chez de nombreux organismes, individus aquatiques compris (Crook *et al.*, 2014). La mémoire à court

terme d'un danger potentiel permet le développement de comportements adaptés à cette situation comme l'augmentation de comportements de fuite ou d'agressivité (Bruintjes & Radford, 2013; Rupia *et al.*, 2016). Cette variabilité observée entre réplica pourrait donc être le fruit d'une sensibilisation des individus au test, suite à la reconnaissance de stimuli associé à une expérience négative ou un danger potentiel (Domenici, 2010). Afin de parer cette éventualité, les mêmes tests pourraient être réalisés, mais avec des temps de repos plus longs entre chaque réplicas.

2.3. Variabilité entre les différents stades de vie

Malgré la variabilité inter-individuelle, l'hypothèse d'une possible habituation entre réplicas et la possibilité de l'existence de sensibilisation lors des seconds réplicas, il est possible de distinguer certains patterns comportementaux évoluant avec l'âge chez le killifish turquoise.

2.3.1. Locomotion

En termes de mobilité générale, au stade juvénile, nos résultats montrent que les individus sont moins mobiles que pendant le reste de leur vie. Ils deviennent plus mobiles aux stades adultes et retrouvent une mobilité moins élevée à leurs derniers stades de vie.

À l'âge de 5 semaines, stade juvénile, les moyennes prédites sont plus faibles pour les vitesses moyennes, les mobilités moyennes et le pourcentage de temps passé en mouvement dans le cadre des deux tests ainsi que pour la fréquence de mise en mouvement dans le Shelter test. Une augmentation forte des valeurs prédites de ces variables est observée à l'âge de 9 ou 12 semaines. Une explication à cette augmentation apparente de locomotion réside dans l'hypothèse que les individus passent d'un stade de vie juvénile à un stade adulte. Lors de ce passage, les membres locomoteurs des individus se développent sensiblement et leur capacité à se déplacer augmente de la même façon (Heid, 2018). Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation importante de la taille et du poids des individus testés entre les âges de 5 et 9 semaines. Des études réalisées précédemment sur le killifish turquoise ne démontrent pas de différences de locomotion entre ces stades de vie (Genade *et al.*, 2005; Valenzano *et al.*, 2006). S'il s'avère que la souche GRZ vit effectivement plus longtemps en laboratoire à l'heure actuelle, peut-être que les comparaisons entre les âges de 5 et 9 semaines chez le killifish turquoise dans ces études réalisées il y a plus de 10 ans correspondent à l'heure actuelle à des stades de vie plus avancés. Dans ce cas, nos observations réalisées sur le stade 5 semaines correspondraient à des observations faites sur un stade encore plus juvénile que celui étudié dans les articles de Genade *et al.* et de Valenzano *et al.* (Genade *et al.*, 2005; Valenzano *et al.*,

2006). La véracité de cette hypothèse justifierait les différences d'observations entre ce mémoire et ces études.

Pour les variables étudiées ci-dessus, les évolutions entre les autres stades peuvent varier. En général, un maximum de locomotion est observé à l'âge de 12 semaines, et à partir de ce maximum, trois cas de figure sont observés. Soit les valeurs des variables restent stables jusqu'à la fin de la vie de l'individu (Mobilité, vitesse en Open field), soit elles diminuent progressivement jusqu'à l'âge de 19 semaines (Pourcentage de temps passé en mouvement en Shelter test), soit elles diminuent drastiquement jusqu'à l'âge de 19 semaines (Vitesse en Shelter test, fréquence de mise en mouvement en Shelter test). Le pourcentage de temps passé en mouvement en Open field augmente cependant à l'âge de 19 semaines. Cette variable n'explique pas à elle seule un taux de locomotion et n'explique qu'un temps passé en mouvement. Ce mouvement peut être lent comme rapide et, au vu des descriptions précédentes, à l'âge de 19 semaines, il semble plus lent qu'à l'âge de 12 semaines. Cette diminution de locomotion chez les killifish turquoise âgés a déjà été démontré à plusieurs reprises (Genade *et al.*, 2005; Valenzano *et al.*, 2006; Reichard *et al.*, 2009; Heid, 2018). D'ailleurs, elle n'est pas caractéristique que chez le killifish turquoise, c'est une caractéristique générale observée chez la majorité des animaux passant par une étape de vieillissement (Cagnaz *et al.*, 2015; Arnold *et al.*, 2017; Hamezah *et al.*, 2017). Certaines des grandes caractéristiques du vieillissement sont l'apparition de dysfonctions mitochondriales, de sénescence cellulaire et d'altération de la communication intercellulaire (López-Otín *et al.*, 2013). Tous ces processus sont impliqués dans la régression et la dysfonction des muscles locomoteurs, résultant en une diminution de la locomotion à un stade de vie vieillissant (Garg & Boppart, 2016; Khanmohammadi *et al.*, 2016). De plus, la dépense énergétique nécessaire à la locomotion lors du vieillissement est nettement supérieure qu'aux stades de vie antérieurs, ce qui amène l'individu à conserver de l'énergie en évitant la locomotion (Ortega & Farley, 2015).

2.3.2. Audace

Outre la locomotion, d'autres patterns comportementaux peuvent être relevés dans nos résultats. La fréquence de rotation en Openfield diminue sensiblement à l'âge de 19 semaines. Cette fréquence peut être le fruit d'un comportement de nage erratique, séquentiel qui est caractéristique de présence d'anxiété, notamment chez le zebrafish (Blaser *et al.*, 2010). En vieillissant, le poisson utilise moins l'abri du Shelter test et hésite moins à évoluer dans la zone centrale de l'Open field. Ces observations peuvent suggérer une baisse d'anxiété ou une augmentation d'audace en fonction de l'âge (Blaser *et al.*, 2010; White *et al.*, 2013).

L'existence de perte de capacités cognitives chez *Nothobranchius furzeri* lorsqu'il vieillit a été démontré à plusieurs reprises (Valenzano *et al.*, 2006; Terzibasi *et al.*, 2008; Kirschner *et al.*, 2012). En prenant ce fait en compte, il est possible que le killifish turquoise perde de plus en plus sa capacité à réagir de façon optimale à la découverte d'un nouvel environnement ou à la présence potentielle de danger.

Il est également possible d'expliquer cette perte de réaction face au danger du killifish turquoise en replaçant ce processus dans le contexte de son histoire de vie. Dès maturité sexuelle, il est nécessaire que ce poisson puisse détecter de façon optimale tout danger potentiel pendant sa reproduction afin d'assurer sa descendance. A un âge avancé, une baisse de la fertilité peut être observée chez cette espèce (Harel *et al.*, 2015; Blažek *et al.*, 2017). Cette perte d'efficacité à se reproduire pourrait être corrélée avec une potentielle diminution de réaction face au risque. En d'autres mots, ayant réussi à se reproduire avec succès et n'ayant plus les mêmes capacités de reproduction à un âge avancé, le poisson n'a plus besoin de dépenser autant d'énergie à la vigilance dans son environnement. De plus, aucun soin parental n'est apporté chez cette espèce et la surveillance de l'environnement à un stade vieillissant pour protéger la progéniture n'a pas lieu d'être (Cellerino *et al.*, 2016).

Un autre point à discuter nécessite de préciser que tous les individus n'ont pas été testés jusqu'à l'âge de 19 semaines. Les 15 individus testés ont tous survécus jusqu'à l'âge de 9 semaines. Cependant, entre chaque test réalisé par la suite, deux individus sont morts. A l'âge de 19 semaines, seul 9 individus ont donc pu être testés. En connaissant l'existence possible de divergence comportementale entre les individus, il convient de se demander si la variabilité observée entre les derniers stades de vie ne reflète pas un biais comportemental inter-individuel. Peut-être qu'il existe un lien entre la longévité des individus et leur comportement. En considérant la vigilance comme source de dépense d'énergie, les individus possédant une personnalité moins anxieuse, plus téméraire éviteraient de dépenser cette énergie au cours de leur vie. Ce gain d'énergie pourrait donc permettre un développement différé du vieillissement. En d'autres mots, d'après cette hypothèse, les individus les plus audacieux vivraient plus longtemps, ce qui entraînerait un biais dans cette analyse du vieillissement. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser une étude plus détaillée de la réponse de chaque individu aux différents tests. Au vu des évolutions prédites des variables en fonction de l'âge par individus, les réponses des poissons mourant avant l'âge de 19 semaines ne semblent pas se situer dans les valeurs extrêmes comme peut l'être le poisson 90 (qui a réalisé tous les tests).

Ce n'est qu'une indication, mais à première vue, ce biais inter-individuel sur l'effet de l'âge ne semble pas être présent.

3. Caractérisation épigénétique

La méthylation de six séquences géniques ont été analysées sur deux organes de deux groupes de poissons âgés de 5 et 9 semaines post-éclosions. Ces séquences géniques sont des parties riches en CpG de deux promoteurs, d'une séquence 5'UTR et de trois introns. Les promoteurs et séquences UTR ont été choisis car leur méthylation peut influencer directement les taux d'expressions géniques, ce qui peut influencer l'expression d'un phénotype (Jones & Takai, 2001; Schübeler, 2015). Les introns ont été choisis car leurs patterns de méthylation sont impliqués dans l'épissage alternatif des ARNs messagers transcrits à partir des séquences géniques. Ces épissages déterminent les produits des gènes et *in fine*, l'expression de phénotypes (Pinney, 2014). Ces séquences ont été étudiées sur quatre gènes : GFAP, TET2, SIRT1 et NFE2L2a.

3.1. GFAP

Pour ce mémoire, une séquence d'une région riche en CpG du promoteur de GFAP a été analysée et les méthylations de deux CpG ont pu être analysées efficacement. L'un est hyper-méthylé et l'autre est hypo-méthylé ; il est donc difficile d'en tirer une conclusion biologique. D'autres CpG sont présents dans la séquence analysée, mais ils n'ont pas pu être étudiés suite à une incertitude d'interprétation des méthylations par le pyroséquenceur. En revanche, nos résultats montrent qu'une cytosine non-associée à une guanosine (C non-Cpg) mais à une adénosine a été détectée comme étant méthylée (dans approximativement 90 % des séquences analysées par pyroséquençage, toutes conditions confondues).

La méthylation non-CpG est un phénomène moins courant que la méthylation CpG chez les vertébrés (Arand *et al.*, 2012). Elle serait aussi, voire plus, corrélée à la diminution de l'expression de gènes que la méthylation CpG et est considérée comme mécanisme épigénétique à part entière étant héritable entre générations et reprogrammée entre cellules. (Grandjean *et al.*, 2007; Bellizzi *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2014; Pinney, 2014). Cette méthylation est également susceptible d'être impliquée dans des régulations géniques médiées par des facteurs environnementaux (Pinney, 2014). Tout comme la méthylation CpG, la méthylation non-CpG est impliquée dans le processus de vieillissement et particulièrement dans le vieillissement cérébral ainsi que dans l'efficacité de la cognition (Barter & Foster, 2018; Van houecke *et al.*, 2018). Il a notamment été démontré que ces méthylations sont plus propices à

exister dans des tissus cérébraux que dans d'autres tissus (Kozlenkov *et al.*, 2013). Il a aussi été suggéré que le nombre de cytosines non-CpG cibles de méthylations augmente fortement dans les tissus neuronaux vieillissants (Barter & Foster, 2018).

GFAP est le gène qui code pour la protéine Gfap (Glial fibrillary acidic protein) qui est impliquée dans la formation de la glyosis, processus de cicatrisation gliale observée lors de lésions cérébrales (Tozzini *et al.*, 2012). Elle est utilisée comme bio-marqueur dans le vieillissement lorsqu'il est supposé que ce processus est source de maladies neuro-dégénératives et de diminution des capacités cognitives (Tozzini *et al.*, 2012; Muck *et al.*, 2018). Il a déjà été démontré chez *Nothobranchius furzeri* ainsi que chez d'autres espèces qu'une augmentation de l'expression de ce gène est observée avec le vieillissement et la perte de capacités cognitives (Laping *et al.*, 1994; Genade & Lang, 2013). L'existence de méthylation non-CpG dans le promoteur de GFAP est donc très intéressante en termes de vieillissement et de neuro-dégénération. Cette méthylation en association avec l'hyper méthylation observée sur un CpG de la séquence du promoteur de GFAP pourrait signifier la répression de la transcription de ce gène aux âges de 5 et 9 semaines chez *N. furzeri*, ce qui corroborerait le fait que ce gène est principalement actif lors du vieillissement. Une étude plus détaillée de la méthylation totale ce gène sur plusieurs stades de vie chez le killifish turquoise pourrait être très informative quand à une possible régulation épigénétique du vieillissement cérébral du poisson.

3.2. TET2

La région 5'UTR de TET2 est en partie hypo-méthylée chez les individus étudiés dans ce mémoire. Cela pourrait signifier que le gène soit libre d'être exprimé aux âges de 5 et 9 semaines. Dans nos résultats, l'îlot CpG du septième intron de TET2 analysé est hyper-méthylé. Cette méthylation, en tant qu'information épigénétique, pourrait être essentielle au bon épissage du gène et à la stabilité de sa transcription (Malousi & Kouidou, 2012; Rigal *et al.*, 2012; Ceccarelli *et al.*, 2014). En comparant les transcrits de TET2 du killifish turquoise aux transcrits d'autres poissons sur le Genome browser de *Nothobranchius furzeri* (Reichwald *et al.*, 2015), l'épissage de cet intron semble être bien conservé et donc être fort régulé. L'hypo-méthylation de l'UTR en association avec l'hyper-méthylation de l'intron de TET2 suggère une expression efficace et stabilisée du gène chez les individus étudiés.

TET2 est un gène codant pour la protéine Tet2 (Ten-eleven-translocation 2), une methylcytosine dioxigenase. Cette protéine se lie à l'ADN et converti les marques épigénétiques 5-methylcytosine en 5-hydroxymethylcytosine qui peuvent éventuellement être

exclues du génome (Polanowski *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2019). C'est donc un gène impliqué dans la déméthylation de cytosines. En conséquence, il est considéré comme acteur majeur dans la régulation de marques épigénétiques (Polanowski *et al.*, 2014). Des changements de méthylations de ce gène en fonction de l'âge ont déjà été démontrés chez l'homme, la souris et la baleine et une diminution d'expression de TET2 en fonction de l'âge suggère que ce gène régule avec moins d'importance la méthylation génique lors du vieillissement (Polanowski *et al.*, 2014). (Heid, 2018; Jessop & Toledo-Rodriguez, 2018). Ce fait nous conforte dans l'idée que TET2 est probablement exprimé de façon stable chez nos individus à 5 et 9 semaines, et il serait intéressant d'analyser cette méthylation chez des individus plus vieux.

3.3. SIRT1

Les deux îlots CpG analysés dans ce gène sont tous deux situés dans des introns du gène. L'îlot de l'intron 1 est hyper-méthylé. Cela peut indiquer une bonne régulation de son épissage (Malousi & Kouidou, 2012; Rigal *et al.*, 2012; Ceccarelli *et al.*, 2014). Une différence significative de méthylation a été observée entre le foie et le cerveau des individus à l'âge de 9 semaines. La moyenne de méthylation dans le cerveau est de 10 % inférieure à celle du foie. Cela peut indiquer une activité différente de la transcription du gène entre ces deux organes. SIRT1 est un gène qui code pour la protéine Sirt1 (Sirtuine 1). Cette protéine est une lysine dé-acétylase et de ce fait est également considérée comme actrice dans des mécanismes épigénétiques. Elle est impliquée dans des processus épigénétiques liés au vieillissement et son expression est particulièrement corrélée avec une prolongation de l'espérance de vie (Wątroba *et al.*, 2017). Elle est liée au développement de maladies neuro-dégénératives et l'augmentation de son expression a déjà été mise en évidence lors du vieillissement du killifish turquoise (Genade *et al.*, 2005; Durollet, 2015; Heid, 2018). Puisque SIRT1 est impliqué dans le développement de maladies neuro-dégénératives, il est possible que son expression dans le cerveau soit altérée par rapport à celle du foie, ce qui pourrait expliquer nos résultats (Wątroba *et al.*, 2017). L'îlot du sixième intron de SIRT 1 est moyennement méthylé dans cette analyse. En comparant les transcrits de SIRT1 du killifish turquoise aux transcrits d'autres poissons sur le Genome browser de *Nothobranchius furzeri* (Reichwald *et al.*, 2015), il semblerait que l'intron 6 soit situé dans une zone d'épissage alternatif marquée. Cette méthylation moyenne pourrait indiquer l'existence de différenciation dans les transcrits de SIRT 1 chez les individus étudiés.

3.4. NFE2l2a

Notre analyse de la méthylation d'un îlot cpg du promoteur de NFE2l2a démontre une hypo-méthylation des CpGs analysés. Cette hypo-méthylation suggère une expression libre du gène chez nos individus. NFE2l2a est un gène codant pour le nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nfe2l2) aussi connu sous le nom de Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Ce facteur apporte une protection contre le stress oxydatif en induisant une réponse anti-oxydante et joue de nombreux rôles dans le développement de maladies diverses (Mills *et al.*, 2019). Lors du vieillissement, les réponses anti-oxydatives diminuent d'intensité et il a été démontré une diminution d'expression génique de Nfe2l2a lors du vieillissement. Il a également été démontré que ce gène est sujet à des régulations épigénétiques, son ARN messenger étant ciblé par des micro-ARNs probablement impliqués dans le processus de vieillissement (Zhang & Davies, 2015). L'étude de stades plus vieux des killifish turquoise pourrait donc mettre en évidence une augmentation de la méthylation du promoteur de ce gène. Le même type d'étude réalisé en parallèle sur gène de Keap1, partenaire mécanistique de Nrf2, pourrait également être intéressant (Palsamy *et al.*, 2014).

Conclusion

La réalisation de ce mémoire a permis d'établir deux référentiels distincts de marqueurs biologiques liés au vieillissement chez *Nothobranchius furzeri* dans nos laboratoires.

Premièrement, un référentiel phénotypique reprend les résultats de deux tests comportementaux et de deux mesures morphologiques réalisés sur plusieurs individus à cinq stades de leur vie. Ces résultats sont accompagnés des mortalités des poissons analysés. Le référentiel comportemental permet de souligner une variabilité inter-individuelle élevée dans les réponses aux deux tests réalisés. Cette variabilité peut soulever l'hypothèse de l'existence de traits de personnalité ou de plasticité comportementale chez cette espèce. Une variabilité des réponses aux tests a également été établie entre les différents stades de vie étudiés. Cette variabilité peut être traduite par une augmentation de l'audace des individus vieillissants, accompagnée d'une diminution de leurs capacités de locomotion. Elle peut également refléter une habituation aux tests avec le temps, ce qui suggère l'existence d'une forme d'apprentissage chez cette espèce. L'analyse de la mortalité des individus a permis de suggérer une augmentation notoire de l'espérance de vie de la souche GZR en laboratoire à l'heure actuelle.

Finalement, un référentiel de méthylation de séquences géniques a été établi sur deux âges et deux organes différents chez le killifish turquoise. Six séquences géniques différentes ont pu être caractérisées et peuvent être étudiées à l'avenir sur des stades de vie plus avancés de cette espèce. De plus, la méthylation d'une cytosine non-CpG a été mise en évidence et la séquence génique dans laquelle elle a été détectée s'avère être particulièrement intéressante pour une étude du vieillissement cérébral du poisson.

Perspectives

La base de données élaborée dans la partie comportementale de ce mémoire est une source potentielle de nombreux approfondissements sur l'étude du comportement de *Nothobranchius furzeri*. Une étude des modèles linéaires créés pourrait permettre une étude détaillée de la réponse de chaque individu aux tests comportementaux et, en association avec d'autres tests, pourrait permettre une étude de traits de personnalité. Afin d'étudier une potentielle habituation aux tests au cours de l'âge, d'autres modélisations peuvent être intéressantes comme, par exemple, la mise en effet aléatoire de l'âge au lieu de l'individu afin d'estimer une répétabilité du test, non plus entre individus, mais au cours du vieillissement. Un autre design expérimental peut également être intéressant pour approfondir le sujet : au lieu de suivre les mêmes individus sur plusieurs stades de vie, plusieurs groupes d'individus seraient étudiés séparément sur une tranche d'âge spécifique. Si l'augmentation de l'audace persiste au cours du temps, l'hypothèse d'un effet de l'âge plutôt que d'une habituation au test serait grandement renforcée. De plus, ces individus pourraient être analysés directement en pyroséquençage, ce qui permettrait de lier phénotypes et méthylation. Vis-à-vis des méthylations analysées, une étude supplémentaire sur des âges plus avancés serait idéale pour estimer leur évolution lors du vieillissement. Ce mémoire a tout de même permis la caractérisation de plusieurs aspects du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* dans notre laboratoire, étape préliminaire aux futures études qui y seront réalisées sur ce modèle

Remerciements

Je tiens à remercier Antoine Wittorski pour son encadrement, ses conseils ainsi que pour le temps et l'énergie qu'il m'a consacrés. Je remercie également Frédéric Silvestre pour ces conseils, son temps et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette étude. Merci à l'ensemble de l'URBE pour leur accueil et leur aide apportée dans les différentes étapes de ce mémoire. Je tiens à remercier particulièrement Jérôme Lambert pour son implication dans l'analyse par pyroséquençage, Valentine Chapelle pour ses conseils sur Ethovision, Enora Flamion pour la dissection et tous les autres membres de l'équipe de Frédéric Silvestre pour leurs conseils et leur amitié.

Bibliographie

- Aamidor, S.E., Yagound, B., Ronai, I. & Oldroyd Benjamin, P. 2018. Sex mosaics in the honeybee: how haplodiploidy makes possible the evolution of novel forms of reproduction in social Hymenoptera. *Biol. Lett.* **14**: 20180670. Royal Society.
- Alexis, D. 2017. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums.
- Allen, B., Lippner, G., Chen, Y.T., Fotouhi, B., Momeni, N., Yau, S.T., *et al.* 2017. Evolutionary dynamics on any population structure. *Nature* **544**: 227–230. Nature Publishing Group.
- Api, M., Terzibasi, E., Olivotto, I., Cellerino, A., Biondi, P. & Carnevali, O. 2017. Effects of Parental Aging During Embryo Development and Adult Life: The Case of *Nothobranchius furzeri*. *Zebrafish* **15**: 112–123.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., *et al.* 2012. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLoS Genet.* **8**: e1002750. Public Library of Science.
- Arnold, J.C., Cantu, M.A., Kasanga, E.A., Nejtek, V.A., Papa, E. V., Bugnariu, N., *et al.* 2017. Aging-related limit of exercise efficacy on motor decline. *PLoS One* **12**: e0188538. Public Library of Science.
- Awise, J.C. & Tatarenkov, A. 2015. Population genetics and evolution of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*, the world's only self-fertilizing hermaphroditic vertebrate. *J. Fish Biol.* **87**: 519–538. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Ayala, F.J. 1982. Beyond Darwinism? The Challenge of Macroeolution to the Synthetic Theory of Evolution. *PSA Proc. Bienn. Meet. Philos. Sci. Assoc.* **1982**: 275–291. The University of Chicago Press.
- Barter, J.D. & Foster, T.C. 2018. Aging in the Brain: New Roles of Epigenetics in Cognitive Decline. *Neuroscientist* **24**: 516–525.
- Bellizzi, D., D'Aquila, P., Scafone, T., Giordano, M., Riso, V., Riccio, A., *et al.* 2013. The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA Res.* **20**: 537–547. Oxford University Press.
- Bender, J. 2004. Dna Methylation and Epigenetics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 41–68.

- Blagosklonny, M. V. 2010. Revisiting the antagonistic pleiotropy theory of aging: TOR-driven program and quasi-program. *Cell Cycle* **9**: 3151–3156.
- Blaser, R.E., Chadwick, L. & McGinnis, G.C. 2010. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **208**: 56–62. Elsevier B.V.
- Blažek, R., Poláčik, M., Kačer, P., Cellerino, A., Řežucha, R., Methling, C., *et al.* 2017. Repeated intraspecific divergence in life span and aging of African annual fishes along an aridity gradient. *Evolution (N. Y.)*. **71**: 386–402. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Boggs, C.L. 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.* **23**: 27–37.
- Bruintjes, R. & Radford, A.N. 2013. Context-dependent impacts of anthropogenic noise on individual and social behaviour in a cooperatively breeding fish. *Anim. Behav.* **85**: 1343–1349. Elsevier Ltd.
- Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A. & Fraga, M.F. 2009. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **8**: 268–276.
- Camougrand, N. & Rigoulet, M. 2001. Aging and oxidative stress : studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respir. Physiol.* **128**: 393–401.
- Carter, A.J.R. & Nguyen, A.Q. 2011. Antagonistic pleiotropy as a widespread mechanism for the maintenance of polymorphic disease alleles. *BMC Med. Genet.* **12**: 160.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C. & Martins, C.I.M. 2013. Can We Predict Personality in Fish? Searching for Consistency over Time and across Contexts. *PLoS One* **8**: e62037. Public Library of Science.
- Ceccarelli, V., Nocentini, G., Billi, M., Racanicchi, S., Riccardi, C., Roberti, R., *et al.* 2014. Eicosapentaenoic Acid Activates RAS/ERK/C/EBP β Pathway through H-Ras Intron 1 CpG Island Demethylation in U937 Leukemia Cells. *PLoS One* **9**: e85025. Public Library of Science.
- Cellerino, A., Valenzano, D.R. & Reichard, M. 2016. From the bush to the bench: The annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biol. Rev.* **91**: 511–533.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J. & Van Deursen, J.M. 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nat. Med.* **21**: 1424–1435.

- Coppens, C.M., De Boer, S.F. & Koolhaas, J.M. 2010. Coping styles and behavioural flexibility: Towards underlying mechanisms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**: 4021–4028.
- Costa, W.J.E.M. 2018. Comparative morphology , phylogeny and classification of African seasonal killifishes of the tribe Nothobranchiini (Cyprinodontiformes : Aplocheilidae). *Zool. J. Linn. Soc.* **20**: 1–21.
- Cragnaz, L., Klima, R., De Conti, L., Romano, G., Feiguin, F., Buratti, E., *et al.* 2015. An age-related reduction of brain TBPH/TDP-43 levels precedes the onset of locomotion defects in a Drosophila ALS model. *Neuroscience* **311**: 415–421. Pergamon.
- Crook, R.J., Dickson, K., Hanlon, R.T. & Walters, E.T. 2014. Nociceptive sensitization reduces predation risk. *Curr. Biol.* **24**: 1121–1125. Elsevier Ltd.
- Di Cicco, E., Tozzini, E.T., Rossi, G. & Cellerino, A. 2011. The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Exp. Gerontol.* **46**: 249–256. Elsevier Inc.
- Domenici, P. 2010. Context-dependent variability in the components of fish escape response: Integrating locomotor performance and behavior. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* **313 A**: 59–79.
- Douglas, B., Martin, M., Ben, B. & Steve, W. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* **67**: 1–48.
- Durollet, M. 2015. Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* : rôle de la température.
- Filosa, A., Barker, A.J., Dal Maschio, M. & Baier, H. 2016. Feeding State Modulates Behavioral Choice and Processing of Prey Stimuli in the Zebrafish Tectum. *Neuron* **90**: 596–608. Cell Press.
- Fox, J. & Sanford, W. 2019. *An {R} Companion to Applied Regression*, Third Edit (Sage, ed). Thousand Oaks CA.
- Furness, A.I., Lee, K. & Reznick, D.N. 2015. Adaptation in a variable environment: Phenotypic plasticity and bet-hedging during egg diapause and hatching in an annual killifish. *Evolution (N. Y.)* **69**: 1461–1475.

- Garg, K. & Boppart, M.D. 2016. Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche. *J. Appl. Physiol.* **121**: 1053–1058. American Physiological Society.
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D.R., Cattaneo, A., *et al.* 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* **4**: 223–233.
- Genade, T. & Lang, D.M. 2013. Resveratrol extends lifespan and preserves glia but not neurons of the *Nothobranchius guentheri* optic tectum. *Exp. Gerontol.* **48**: 202–212. Pergamon.
- Graf, M., Hartmann, N., Reichwald, K. & Englert, C. 2013. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Exp. Gerontol.* **48**: 17–28. Pergamon.
- Grandjean, V., Yaman, R., Cuzin, F. & Rassoulzadegan, M. 2007. Inheritance of an Epigenetic Mark: The CpG DNA Methyltransferase 1 Is Required for De Novo Establishment of a Complex Pattern of Non-CpG Methylation. *PLoS One* **2**: e1136. Public Library of Science.
- Hamezah, H.S., Durani, L.W., Ibrahim, N.F., Yanagisawa, D., Kato, T., Shiino, A., *et al.* 2017. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Exp. Gerontol.* **99**: 69–79. Pergamon.
- Harel, I., Benayoun, B.A., Machado, B., Singh, P.P., Hu, C.-K., Pech, M.F., *et al.* 2015. A Platform for Rapid Exploration of Aging and Diseases in a Naturally Short-Lived Vertebrate. *Cell* **160**: 1013–1026. Cell Press.
- Heid, J. 2018. Epigenetic characterization of skeletal muscle and heart tissue of the turquoise killifish *Nothobranchius furzeri*, a novel short-lived animal model for aging studies.
- Heitman, J., Sun, S. & James, T.Y. 2013. Evolution of fungal sexual reproduction. *Mycologia* **105**: 1–27. Taylor & Francis.
- Helle, S. 2008. A tradeoff between reproduction and growth in contemporary Finnish women. *Evol. Hum. Behav.* **29**: 189–195. Elsevier.
- Heyn, H. & Esteller, M. 2015. An Adenine Code for DNA: A Second Life for N6-Methyladenine. *Cell* **161**: 710–713. Cell Press.
- Ho, M.W. & Saunders, P.T. 1979. Beyond neo-Darwinism—an epigenetic approach to

- evolution. *J. Theor. Biol.* **78**: 573–591. Academic Press.
- Holliday, R. 2006. Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics* **1**: 76–80.
- Horvath, S. & Raj, K. 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet.* **19**: 371–384. Springer US.
- Hu, C.-K. & Brunet, A. 2018. The African turquoise killifish: A research organism to study vertebrate aging and diapause. *Aging Cell* e12757.
- Jessop, P. & Toledo-Rodriguez, M. 2018. Hippocampal TET1 and TET2 Expression and DNA Hydroxymethylation Are Affected by Physical Exercise in Aged Mice .
- Johnson, A. & Hamilton, T.J. 2017. Modafinil decreases anxiety-like behaviour in zebrafish. *PeerJ* **5**: e2994.
- Jones, P.A. & Takai, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* (80-.). **293**: 1068–1070.
- Kellis, M., Birren, B.W. & Lander, E.S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**: 617–24.
- Khanmohammadi, R., Talebian, S., Hadian, M.R., Olyaei, G. & Bagheri, H. 2016. Characteristic muscle activity patterns during gait initiation in the healthy younger and older adults. *Gait Posture* **43**: 148–153. Elsevier.
- Kirkwood, T.B.L., Rose M, R., Harvey Paul, H., Partridge, L. & Southwood Sir, R. 1991. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **332**: 15–24. Royal Society.
- Kirschner, J., Weber, D., Neuschl, C., Franke, A., Böttger, M., Zielke, L., *et al.* 2012. Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*—a new vertebrate model for age research. *Aging Cell* **11**: 252–261. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Kishi, S. 2014. Using zebrafish models to explore genetic and epigenetic impacts on evolutionary developmental origins of aging. *Transl. Res.* **163**: 123–35. Elsevier.
- Klose, R.J. & Bird, A.P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 89–97. Elsevier Current Trends.
- Kovalchuk, I. 2012. Transgenerational Epigenetic Inheritance in Animals. *Front. Genet.* **3**: 1–

- Kozlenkov, A., Roussos, P., Timashpolsky, A., Barbu, M., Rudchenko, S., Bibikova, M., *et al.* 2013. Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res.* **42**: 109–127.
- Kumar, C.M. & Rizvi, S.I. 2019. Invertebrate and vertebrate models in aging research. A review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **163**.
- Kutschera, U. & Niklas, K.J. 2004. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften* **91**: 255–276.
- Laping, N.J., Teter, B., Anderson, C.P., Osterburg, H.H., O’Callaghan, J.P., Johnson, S.A., *et al.* 1994. Age-related increases in glial fibrillary acidic protein do not show proportionate changes in transcription rates or DNA methylation in the cerebral cortex and hippocampus of male rats. *J. Neurosci. Res.* **39**: 710–717.
- Larsch, J. & Pantoja, C. 2019. Learning: Complexities of Habituation in Escaping Zebrafish Larvae. *Curr. Biol.* **29**: R292–R294. Cell Press.
- Lemaître, J.-F., Berger, V., Bonenfant, C., Douhard, M., Gamelon, M., Plard, F., *et al.* 2015. Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proc. R. Soc. B* **282**.
- Lenth, R. 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- Li, H., Wei, C., Zhou, R., Wang, B., Zhang, Y., Shao, C., *et al.* 2019. Mouse models in modeling aging and cancer. *Exp. Gerontol.* **120**: 88–94. Pergamon.
- Li, L. & Dahiya, R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194–217.
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C. & Maleszka, R. 2010. The honey bee epigenomes: Differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* **8**: e1000506.
- Malousi, A. & Kouidou, S. 2012. DNA hypermethylation of alternatively spliced and repeat sequences in humans. *Mol. Genet. Genomics* **287**: 631–642.
- Martin, W.F., Garg, S. & Zimorski, V. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin.

- Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**: 20140330.
- Mills, M.G., Ramsden, R., Ma, E.Y., Corrales, J., Kristofco, L.A., Baylor, W., *et al.* 2019. CRISPR-generated Nrf2a loss- and gain-of-function mutants facilitate mechanistic analysis of chemical oxidative stress-mediated toxicity in zebrafish. , doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00346.
- Mitteldorf, J. & Martins, A.C.R. 2014. Programmed Life Span in the Context of Evolvability. *Am. Nat.* **184**: 289–302. The University of Chicago Press.
- Muck, J., Kean, S. & Valenzano, D.R. 2018. *The Short-Lived African Turquoise Killifish (Nothobranchius furzeri)*, Second Edi. Elsevier Inc.
- Murphy, W.J. & Collier, G.E. 1996. Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fish genus Rivulus (Cyprinodontiformes, Rivulidae): implications for Caribbean and Central American biogeography. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 642–9.
- Norris, R.D. 1996. Symbiosis as an evolutionary innovation in the radiation of Paleocene planktic foraminifera. *Paleobiology* **22**: 461–480. Cambridge University Press.
- Ortega, J.D. & Farley, C.T. 2015. Effects of aging on mechanical efficiency and muscle activation during level and uphill walking. *J. Electromyogr. Kinesiol.* **25**: 193–198. Elsevier.
- Pal, S. & Tyler, J.K. 2010. Epigenetics and aging. *Exp. Gerontol.* **45**: 253–254.
- Palsamy, P., Bidasee, K.R., Ayaki, M., Augusteyn, R.C., Chan, J.Y. & Shinohara, T. 2014. Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts. *Free Radic. Biol. Med.* **72**: 134–148. Pergamon.
- Patil, V., Ward, R.L. & Hesson, L.B. 2014. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* **9**: 823–828.
- Pilz, P.K.D. & Schnitzler, H.-U. 1996. Habituation and Sensitization of the Acoustic Startle Response in Rats: Amplitude, Threshold, and Latency Measures. *Neurobiol. Learn. Mem.* **66**: 67–79. Academic Press.
- Pinney, E.S. 2014. Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond.
- Platzer, M. & Englert, C. 2016. *Nothobranchius furzeri* : A Model for Aging Research and

- More. *Trends Genet.* **32**: 543–552. Elsevier Ltd.
- Polačik, M., Blažek, R. & Reichard, M. 2016. Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Nat. Protoc.* **11**: 1396–1413.
- Polanowski, A.M., Robbins, J., Chandler, D. & Jarman, S.N. 2014. Epigenetic estimation of age in humpback whales. *Mol. Ecol. Resour.* **14**: 976–987.
- Polverino, G., Ruberto, T., Staaks, G. & Mehner, T. 2016. Tank size alters mean behaviours and individual rank orders in personality traits of fish depending on their life stage. *Anim. Behav.* **115**: 127–135. Elsevier Ltd.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rasband, W.S. 2018. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Reichard, M. & Polačik, M. 2019. *Nothobranchius furzeri*, an “instant” fish from an ephemeral habitat. *Elife* **8**.
- Reichard, M., Polačik, M. & Sedláček, O. 2009. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *J. Fish Biol.* **74**: 198–212. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B.R., Hartmann, N., Pietsch, S., *et al.* 2015. Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell* **163**: 1527–38. Elsevier.
- Relton, C.L. & Smith, G.D. 2010. Epigenetic epidemiology of common complex disease: Prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med.* **7**.
- Renfree, M.B. & Shaw, G. 2000. Diapause. *Annu. Rev. Physiol.* **62**: 353–375.
- Rigal, M., Kevei, Z., Péliissier, T. & Mathieu, O. 2012. DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO J.* **31**: 2981–2993. John Wiley & Sons, Ltd.
- Rupia, E.J., Binning, S.A., Roche, D.G. & Lu, W. 2016. Fight-flight or freeze-hide? Personality and metabolic phenotype mediate physiological defence responses in flatfish. *J. Anim. Ecol.* **85**: 927–937. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Salthouse, T.A. 2010. Selective review of cognitive aging. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **16**: 754–

- Schübeler, D. 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature* **517**: 321–326.
- Terzibasi, E., Riccardo, D. & Cellerino, A. 2007. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Exp. Gerontol.* **42**: 81–89.
- Terzibasi, E., Valenzano, D.R., Benedetti, M., Roncaglia, P., Cattaneo, A., Domenici, L., *et al.* 2008. Large Differences in Aging Phenotype between Strains of the Short-Lived Annual Fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS One* **3**: e3866. Public Library of Science.
- Thoré, E.S.J., Steenaerts, L., Philippe, C., Grégoir, A., Brendonck, L. & Pinceel, T. 2018. Individual behavioral variation reflects personality divergence in the upcoming model organism *Nothobranchius furzeri*. *Int. J. Bus. Innov. Res.* **17**: 8448–8457.
- Tozzini, E.T., Baumgart, M., Battistoni, G. & Cellerino, A. 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: Localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell* **11**: 241–251.
- Tuminello, E.R. & Han, S.D. 2011. The apolipoprotein E antagonistic pleiotropy hypothesis: Review and recommendations. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2011**: 726197.
- Valdesalici, S. & Cellerino, A. 2003. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **270**: 189–191.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L. & Cellerino, A. 2006. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* **5**: 275–278.
- Van houcke, J., Bollaerts, I., De Groef, L. & Moons, L. 2018. *Modeling Aging and Age-Associated Pathology in Zebrafish*, Second Edi. Elsevier Inc.
- Wątroba, M., Dudek, I., Skoda, M., Stangret, A., Rządziejewicz, P. & Szukiewicz, D. 2017. Sirtuins, epigenetics and longevity. *Ageing Res. Rev.* **40**: 11–19. Elsevier.
- White, J.R., Meekan, M.G., McCormick, M.I. & Ferrari, M.C.O. 2013. A Comparison of Measures of Boldness and Their Relationships to Survival in Young Fish. *PLoS One* **8**: e68900. Public Library of Science.
- Winandy, L. & Denoël, M. 2013. Cues from Introduced Fish Alter Shelter Use and Feeding

- Behaviour in Adult Alpine Newts. *Ethology* **119**: 121–129.
- Yang, C.-H., Lin, Y.-D., Chiang, Y.-C. & Chuang, L.-Y. 2016. A Hybrid Approach for CpG Island Detection in the Human Genome. *PLoS One* **11**: e0144748. Public Library of Science.
- Zhang, H. & Davies, K.J.A. 2015. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **88**: 314–336. Pergamon.
- Zhang, W. & Xu, J. 2017. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark. Res.* **5**: 1.
- Zhou, J., Wu, Y. chao, Xiao, B. jun, Guo, X. dong, Zheng, Q. xin & Wu, B. 2019. Age-related Changes in the Global DNA Methylation Profile of Oligodendrocyte Progenitor Cells Derived from Rat Spinal Cords. *Curr. Med. Sci.* **39**: 67–74.

Annexes

Annexe 1 Séquences des primers utilisés pour le pyroséquençage

Séquence amplifiée	Type de primer	Séquence
Promoteur de GFAP	Forward	ATTTTAAGTATTGTAGATATGGATGTAGGA
	Reverse	ACTAAACTATCAACATTCCTCC
	Sequencing	CTATCAACATTCCTCCC
5'UTR de TET2	Forward	AAGGGTAGTTATTTTGTTTTTTTTTTGT
	Reverse	TCTCCCAACTAAAACCAAACCTTAC
	Sequencing	ATTTTGTTTTTTTTTTGTTTTATGAA
Intron 7 de TET2	Forward	TTGTATTTTTTTTATTGTGTGGGTA
	Reverse	ATTTTACAAATCCAACTTCAAAT
	Sequencing	TTTTTTTATTGTGTGGGTAT
Intron 1 de SIRT1	Forward	GTTGAGTTGGAAGGTAGAGT
	Reverse	AACACATAAATATTCTACTTCCTAATC
	Sequencing	GTTGGAAGGTAGAGTT
Intron 6 de SIRT1	Forward	GTTGATAGGAATAGTTGTGGTTAATAGA
	Reverse	CCCATTCCTATCTTTCCTTC
	Sequencing	GGAATAGTTGTGGTTAATAGAATTT
Promoteur de Nfe2l2a	Forward	GTAGTTTTTATTATATGTAGTTGGAAGAAT
	Reverse	CACTTATCTACTAAAACTCCACACT
	Sequencing	ATGTAGTTGGAAGAATGT

Annexe 2 Séquences amplifiées en pyroséquençage

Location	Séquence
Promoteur de GFAP	GATTCCTGTTGGGATCTAGTTACGTAACGACATAACTGCTAATAAA CTCGAGAATAATTTAAAACATTGGATTCAATTTTATAGAGTTACAGGTT TTCCG
5'UTR de TET2	ACGGTCTATCCTCCACATCAATATTCATGGAAACCAGCCTGACGTTG GCTCTCATCATCAGGAGAAGCCCGGGTGTCGCTGTTTCACCGGCCGG AGAAGTGCTCTCATAAGTCCCTCTGGTGAGACGCAGCTTTGCCACGA GAGGAACA
Intron 7 de TET2	CGGGACGAGCCCCCGCACCGTGAGAACAAACATCTCAGCTCTAAAG CCGATCTTCATCCGCATACGTCACATGTCACTTGATCAGGAAGCAGA AAATCCATGTGTTAGGAGATCGTTTTGGGCCGCTGCTGTAAGAAAA GTGAGGCGCGA
Intron 1 de SIRT1	CTCGATTTACCGATCATCTACTTTCCTACCCTCACCTATGGCCACGAG CTTTGGGTAGTGACCGAAAGAACAAGATCGTGGATACGAGCGGCCC CCGCACCATGAGAACAAACATCTCGGCTCTAAAGCCGATCTTCATCC GCATACGTCACACGTCACGT
Intron 6 de SIRT1	TTTCCACCGGAGCCGTCAGCAGCGCGAGTCGGCCGCGTCTCAGGAG CAGCATGTCGCGGCCCTTACGCGCCGGTTCTATTTTCTACGCGCGAC GCCTCTGAAACGGGTCAAGTTCGACATTTTTG
Promoteur de Nfe2l2a	CGACGTGGAGCTGCCAAACGTGAACGCGTGCTCGTGAGCGCGCACC AGGGAGAGAGGAGGGGAGAAAAATGGGATTTTATAGTGTAATTCAC GGAGAAGCAGAGCGAGCTGCACGTT

Annexe 3 Structures des modèles et transformations des variables comportementales

Variable	Test	Modèle	Transformation
Latence	ST	Latence~Age+(1 Identité)	Ln(1+x)
Fréquence	ST	Frequence~Age+Replica+Taille+(1 Identité)	Log(glm)
Temps passé en arène	ST	Temps~Replica+(1 Identité)	x^2
Temps/fréquence	ST	Temps/F~Age+Replica+(1 Identité)	Ln(x)
Temps/fréquence	ST	Temps/F~Age+Replica+Conductivité+(1 Identité)	Ln(x)
Vitesse	ST	Vitesse~ Age+Température+(1 Identité)	Ln (1+x)
Mobilité	ST	Mobilité~Age+Replica+(1 Identité)	Ln (1+x)
Pourcentage de temps en mouvement	ST	Pourcentage~ Age+Température+(1 Identité)	Ln (1+X)
Fréquence de mise en mouvement	ST	Fréquence~Age+Température+Taille+Poids+(1 Identité)	Log(glm)
Rotation	ST	Rotation~Age+Poids+Conductivité+(1 Identité)	Log(glm)
Latence	OF	Latence~Age+Réplica+(1 Identité)	^(1/2)
Fréquence	OF	Fréquence~Age+Réplica+Poids+(1 Identité)	Log(glm)
Temps passé en zone	OF	Temps~ Age+Réplica+(1 Identité)	Ln(1+x)
Vitesse	OF	Vitesse~Age+Replica+Température+(1 Identité)	-
Mobilité	OF	Mobilité~Age+(1 Identité)	-
Pourcentage de temps en mouvement	OF	Pourcentage~Age+Replica+Température+(1 Identité)	-
Fréquence de mise en mouvement	OF	-	-
Fréquence de rotation	OF	Fréquence~Age+Réplica+Poids+(1 Identité)	Log(glm)

