



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Les individus âgés de *Drosophila melanogaster* avec une fusion mitochondriale altérée dans le muscle présentent des altérations systémiques dans la voie de signalisation Insuline/IGF-1

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología
Curso 2017-2018
València/Montpellier, junio de 2018

Autor: Adrián Sisternes Domene
Tutor UPV: Máximo Ibo Galindo Orozco
Co-tutora externa: Andrea Tapia González



Memoria en francés . Título en castellano: Individuos longevos de *Drosophila melanogaster* con una fusión mitocondrial alterada en músculo presentan alteraciones sistémicas en la vía de señalización Insulina/IGF-1.

Resumen

El desequilibrio de la dinámica mitocondrial es uno de las características propuestas del envejecimiento. Mientras que un estrés severo parece perjudicial, una ligera alteración mitocondrial puede tener efectos positivos en diferentes organismos, extendiendo la vida media a través de una respuesta nuclear compleja (mitohormesis). Estudios recientes han indicado que las moscas *Drosophila* con una función de *Marf* y *Opa* comprometida en el tejido muscular muestran una mejor capacidad muscular y una mayor vida media, acompañadas de una inflexibilidad metabólica. Como diferentes evidencias apuntan hacia una implicación de la vía de señalización Insulina/IGF-1 (IIS) en el control del envejecimiento, el principal objetivo de este estudio es investigar si una alteración de la dinámica mitocondrial en el músculo puede conllevar un mecanismo sistémico de compensación midiendo los niveles de expresión de algunos de los componentes de la vía IIS. Nuestros resultados sugieren que la reducción de la fuerza de señalización de la vía IIS podría prevenir el declive funcional dependiente de la edad y refuerzan la importancia de la homeóstasis muscular y la comunicación intertisular en el envejecimiento.

Palabras clave: *insulina, Drosophila melanogaster, envejecimiento, fusión mitocondrial, dinámica mitocondrial.*

Abstract

Mitochondrial dynamics imbalance is one of the proposed hallmarks in aging. Whereas severe stress appears to be detrimental, mild mitochondrial disturbance may have beneficial effects in different organisms by extending lifespan through a complex nuclear response (mitohormesis). Recent studies have reported that *Drosophila* flies with compromised *Marf* and *Opa1* function in muscular tissue show longer muscular capacity and lifespan, along with a metabolic inflexibility. Since several pieces of evidence point toward an implication of the insulin signaling (IIS) pathway in aging control, the main goal of this study is to investigate whether altering mitochondrial fusion in muscles can lead to a systemic compensatory mechanism by measuring the expression levels of some of the components of the IIS. Our results suggest that reducing the IIS strength could prevent age-dependent decline and reinforce the importance of muscle homeostasis and tissue communication in aging.

Keywords: *insulin, Drosophila melanogaster, aging, mitochondrial fusion, mitochondrial dynamics.*

Résumé

Le déséquilibre de la dynamique mitochondriale est un des marqueurs de vieillissement proposés. Bien qu'un stress sévère puisse être préjudiciable, une perturbation mitochondriale légère peut avoir des effets bénéfiques chez différents organismes en prolongeant la durée de vie par une réponse nucléaire complexe (mitohormèse). Des études récentes chez *D. melanogaster* montrent que les organismes avec une fonction altérée de *Marf* et *Opa1* dans les muscles maintiennent la capacité musculaire pendant plus longtemps et présentent une majeure durée de vie ainsi qu'une inflexibilité métabolique. Comme plusieurs évidences pointent vers une implication de la voie de signalisation Insuline/IGF-1 (IIS) dans le contrôle du vieillissement, le but principal de cette étude est de montrer si l'altération de la fusion mitochondriale dans les muscles peut conduire à un mécanisme de compensation systémique de ce stress, en mesurant les niveaux d'expression de certains composants de la voie IIS. Nos résultats suggèrent que la réduction de la force de la voie IIS pourrait prévenir le déclin dépendant de l'âge et renforcent l'importance de l'homéostasie musculaire et la communication tissulaire dans le vieillissement.

Mots clés: *insuline, Drosophila melanogaster, vieillissement, fusion mitochondriale, dynamique mitochondriale.*

REMERCIEMENTS / ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to thank Ibo. Thank you for taking me into your laboratory last year and for reopening its doors when I needed it. Thanks for your advice and for your support. I have learned many things about *Drosophila* biology, but I'll take the importance of analyzing your results without getting contaminated by the literature.

I would also like to thank all my colleagues in the lab for having created such a comfortable work environment. Thank you Andrea for having read all the documents I printed. Thank you all.

This work is the result of a four years degree in which I have learned not only biotechnology issues. I want to acknowledge here the help of my classmates and to be grateful for the good moments we have passed together. I would like to thank also my classmates in France. *Merci de m'avoir accueilli, de m'avoir aidé, de m'avoir appris autant de choses.*

Thanks to my friends, for having listened to me every time I told them what I was doing in the lab, even though there were aspects you could not understand.

I would like to finish by thanking the support and encouragement of my family. I'm sorry you had to listen to my complicated scientific subjects. *Gràcies papà i mamà per haver-me ensenyat a prendre les meues decisions i pel vostre recolzament. Gràcies per tant d'esforç.*

Gràcies, Josep, pels aprenentatges compartits i per la teua confiança en mi. Que la vida et porte molts encerts i que sigues molt feliç.

Gràcies, Miquel. Per haver-me ensenyat tantes i tantes coses. Pel suport, per la comprensió, per l'estima. Que tinguem sort.

"I am just a child who has never grown up. I still keep asking these 'how' and 'why' questions.

Occasionally, I find an answer"

Stephen Hawking

1942 - 2018

SOMMAIRE

0. Présentation du laboratoire	0
1. Introduction.....	1
1.1. Le processus biologique du vieillissement	1
1.2. La dynamique mitochondriale et son rôle dans la neurodégénération et le vieillessement.....	1
1.3. Le tissu musculaire et la voie IIS dans le vieillissement.....	4
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> comme modèle pour l'étude du vieillissement	5
2. Objectif	5
3. Matériels et Méthodes	6
3.1. Souches utilisées et maintien.....	6
3.2. Le système <i>UAS-GAL4</i>	6
3.3. Méthodes moléculaires	7
3.3.1 Extraction d'ARN	7
3.3.2 RT-PCR	8
3.3.3 PCR quantitative.....	9
3.4. Gráficas y métodos estadísticos empleados.....	10
4. Résultats	11
4.1. Validation de l'extinction génique de <i>Opa1</i> et <i>Marf</i> dans le tissu musculaire	11
4.2. Altérations de la voie de signalisation Insuline/IGF-1	12
5. Discussion	14
6. Conclusions.....	18
7. Bibliographie.....	19

0. PRÉSENTATION DU LABORATOIRE

Le Centre de Recherche Príncipe Felipe (CIPF) est une fondation privée attachée au ministère de la Santé de la *Generalitat Valenciana* (Gouvernement du Pays Valencien).

Depuis près de 50 ans, les chercheurs du Centre de Recherche Príncipe Felipe déploient de grands efforts dans des domaines aussi importants que la médecine régénérative, le cancer, les nouvelles thérapies, la détérioration neuronale...

L'objectif principal du CIPF est la recherche biomédicale fondamentale sur les gènes, les cibles, les processus moléculaires et cellulaires, la nanomédecine et la médecine computationnelle ainsi que sa traduction en pratique clinique, avec un intérêt particulier pour la médecine personnalisée, le cancer et les maladies rares.

En ce qui concerne le laboratoire, la ligne de recherche originale en est la compréhension des mécanismes de base de l'interaction de la signalisation cellulaire et de la polarité cellulaire planaire au cours du développement. Notre modèle expérimental principal est la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*.

De plus, on utilise l'expertise en Génétique et Biologie du Développement et la boîte à outils expérimentale de *Drosophila* pour générer des modèles de maladies afin d'étudier la physiopathologie de plusieurs maladies neuromusculaires, avec un intérêt particulier pour la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth.

Le chercheur en chef est le D. Máximo Ibo Galindo Orozco. Après avoir terminé sa thèse de doctorat au département de Génétique de l'Université de Valence, il a fait un séjour postdoctoral au Royaume-Uni, d'abord au Royal Holloway College de l'Université de Londres, en tant que boursière Marie Curie; et plus tard à l'Université de Sussex en tant que boursier de recherche Wellcome Trust. En 2008, il est retourné en Espagne en tant que chercheur Ramon y Cajal à l'Institut de Biomédecine de Valence (IBV-CSIC).

Introduction et Objectif

1. INTRODUCTION

1. 1. Le processus biologique du vieillissement

Le vieillissement est un processus biologique naturel caractérisé par une perte d'intégrité physiologique, une altération fonctionnelle et une vulnérabilité accrue à la mort. Ce déclin fonctionnel est le principal facteur de risque pour un grand nombre de pathologies humaines, telles que le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [1]. Classiquement, les dommages cellulaires associés à l'accumulation de mutations dépendantes de l'âge ont été considérés comme la cause générale du vieillissement. Cependant, l'émergence croissante de preuves scientifiques indiquant une régulation du vieillissement par différentes voies biologiques a déclenché le nombre de publications scientifiques et de recherches sur le contrôle de la longévité, et a soumis la conception classique du vieillissement à un examen scientifique strict.

Un article récent publié par Otin *et al.* [1] propose neuf caractéristiques qui permettent de conceptualiser les bases du vieillissement, dont la cause pourrait varier dans une gamme de phénomènes physiologiques et de changements dans le fonctionnement des différentes voies métaboliques. L'un de ces dénominateurs communs au vieillissement est un dysfonctionnement mitochondrial croissant, qui se traduit par une diminution de l'efficacité de la chaîne de transport électronique et une réduction de la production d'ATP. La théorie des radicaux libres (TRL) propose que cette perte d'efficacité énergétique génère une augmentation progressive des espèces réactives d'oxygène (ROS), qui à leur tour sont responsables d'une plus grande détérioration mitochondriale. En plus de ce déséquilibre mitochondrial et d'autres altérations cellulaires autonomes, le vieillissement est caractérisé par des perturbations variées dans la communication intertissulaire, y compris une signalisation neurohormonale déséquilibrée, une perte de détection nutritionnelle et une augmentation de la réaction inflammatoire.

1.2. La dynamique mitochondriale et son rôle dans la neurodégénération et le vieillissement

Les mitochondries sont des organites clés dans l'homéostasie cellulaire en raison de leur implication dans une multitude de processus physiologiques, métaboliques et de signalisation [2]. Souvent, les mitochondries sont considérées comme des organites isolés et autonomes, probablement en raison de leur nature bactérienne et de leur origine endosymbiotique. Cependant, les mitochondries sont des organites dynamiques soumis à des événements continus de fusion (union) et de fission (partition) [3].

Ces processus de fusion et de fission sont les principaux régulateurs de la dynamique mitochondriale, un concept qui inclut l'architecture, le mouvement et la connectivité de ces organites avec d'autres, notamment le réticulum endoplasmique [4], et qui joue un rôle crucial dans la biogenèse mitochondriale, puisque la synthèse des mitochondries ne se produit pas *de novo*. Les événements de fusion mitochondriale permettent la correction de nombreuses mutations dans l'ADN mitochondrial par des processus de recombinaison génétique. De plus, ils facilitent la compensation des radicaux libres d'oxygène et le maintien du potentiel de membrane [5]. En outre, la fission permet la distribution et à la réorganisation du réseau mitochondrial, en particulier lors de la division cellulaire, dans

laquelle les cellules filles doivent avoir une charge mitochondriale similaire [6]. Un mécanisme clé régulé par la fission mitochondriale est également la mitophagie: la fragmentation des mitochondries endommagées pour faciliter leur dégradation [7].

La fusion mitochondriale est un événement de complexes mécanismes qui impliquent la fusion des deux membranes lipidiques: la membrane mitochondriale interne et externe. Chez les mammifères, le processus de fusion mitochondriale est régie principalement par les protéines *OPA1* (dans la membrane mitochondriale interne) et *MFN1* et *MFN2* (dans la membrane mitochondriale externe). *OPA1* et les mitofusines 1 et 2 sont des protéines transmembranaires qui se lient à la dynamine et avec une activité GTPase, ce qui est essentiel pour la fusion mitochondriale [3]. Quant à la fission, les protéines clés qui contrôlent le processus sont *DRP1* et *FIS1* [8], bien qu'il existe d'autres qui peuvent déclencher une fragmentation mitochondriale, comme *GDAP1* [9].

De nombreuses études démontrent l'implication de la dynamique mitochondriale dans la régulation de différents processus physiologiques tels que la phosphorylation oxydative, la consommation d'oxygène, l'apoptose, le cycle cellulaire et l'autophagie. En plus, des mutations dans les gènes *Opa1* et *Mfn2* ont également été associées avec deux maladies neurodégénératives: une atrophie optique autosomique dominante et la maladie de Charcot-Marie-Tooth, ce qui établit une relation étroite entre la dynamique mitochondriale et l'étiopathologie de différentes maladies humaines [3].

Une des lignes de recherche de notre équipe porte sur l'étude de la relation entre la dynamique mitochondriale et la maladie de Charcot-Marie-Tooth [10]. Des études récentes dans notre laboratoire montrent que les individus *Drosophila* avec une dynamique mitochondriale altérée dans le tissu musculaire présentent une augmentation de la demi-vie et de l'espérance de vie et maintiennent la compétence neuromusculaire plus longtemps. De plus, l'analyse du profil métabolomique de ces individus suggère une inflexibilité métabolique: une diminution de la glycolyse et une augmentation de la glycogénogénèse avec accumulation de pyruvate et un cycle de Krebs fonctionnel, probablement avec substitution des sucres pour des lipides comme substrat de ce cycle des acides tricarboxyliques. Étant donné que le flux systémique des sucres, des acides gras et des acides aminés est largement orchestré par l'action hormonale de l'insuline, nous pensons que ces changements métaboliques pourraient être liés à des altérations systémiques de la voie de signalisation Insuline/IGF-1 (IIS) [11]. En outre, plusieurs études indiquent un contrôle du vieillissement par différentes voies biologiques, qui incluent la voie IIS. Ces altérations de la voie IIS pourraient donc être à l'origine du phénotype survivant observé chez ces individus.

De plus, l'implication de la dysfonction mitochondriale dans le vieillissement a été expliquée classiquement par la TRL [12]. Cette théorie propose que l'accumulation de ROS provoque des dommages cellulaires irréversibles qui entraînent une perte fonctionnelle, contribuant ainsi au processus de vieillissement. Dans ce contexte, la production de ROS proviendrait d'une augmentation des mutations de l'ADNmt, ce qui entraînerait une diminution de l'efficacité de la chaîne de transport électronique. Cependant, des études plus récentes ont montré que les ROS favorisent la longévité dans différents organismes, peut-être par des mécanismes de compensation qui incluent la mitophagie [13]. Cette

réponse pourrait être différente en fonction de la gravité du stress, ce qui a été connu sous le nom de mitohormèse, bien que cela reste un phénomène controversé au sein de la communauté scientifique [13, 14] On a également proposé que la dynamique mitochondriale puisse être un élément clé de la participation de la fonction mitochondriale dans le vieillissement et les maladies associées au vieillissement. La figure I1 montre le modèle proposé par Seo et al. [15] concernant le rôle de la dynamique mitochondriale dans le vieillissement.

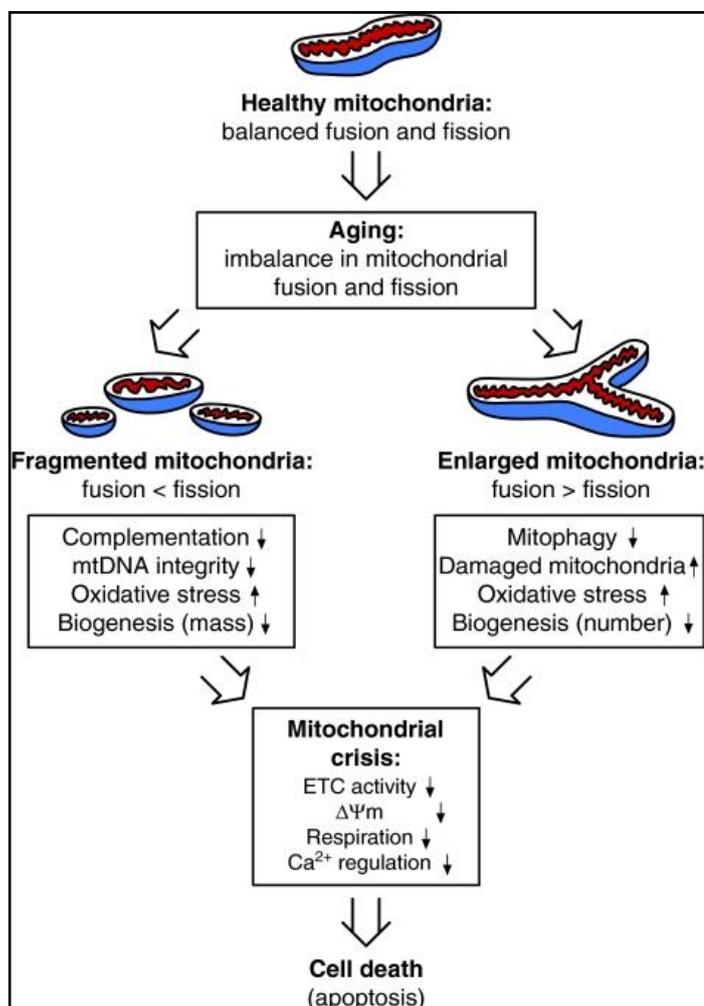


Figure I1. Modèle de l'influence de la dynamique mitochondriale sur le vieillissement. La présence de mitochondries fragmentées peut compromettre l'intégrité de l'ADNmt, et la formation de mitochondries élargies peut altérer la mitophagie et la biogenèse, conduisant à l'accumulation de mitochondries endommagées. Dans les deux cas, les mitochondries anormales sont incapables de remplir leurs rôles vitaux. Par conséquent, les altérations de la dynamique mitochondriale pourraient jouer un rôle causal dans la dysfonction mitochondriale, et augmenter la susceptibilité à la mort cellulaire en réponse à divers types de stress au cours du vieillissement progressif. Image prise de Seo, A. Y., et al. [15]

Le pont principal entre la dynamique mitochondriale et le vieillissement serait donc une diminution de la biogenèse et / ou une dégradation mitochondriale inefficace [16, 17]. La mitophagie est un processus crucial dans la protection des dommages cellulaires causés par l'activation des voies pro-apoptotiques. Cette protection pourrait se produire par la formation d'autophagosomes permettant la dégradation des mitochondries non fonctionnelles, bloquant ainsi la libération mitochondriale des protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme et prévenant la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire. Un déséquilibre de la dynamique, la biogenèse mitochondriale et l'autophagie pourraient

entraîner ainsi l'accumulation de mitochondries sénescents, ce qui à son tour se traduirait par une augmentation de ROS, jusqu'à dépasser un seuil qui déclencherait un processus apoptotique [17].

1.3. Le tissu musculaire et la voie IIS dans le vieillissement

La sarcopénie, la perte involontaire de la masse musculaire et de la force au fil du temps, est une des causes fondamentales des altérations fonctionnelles du vieillissement [18]. Des études épidémiologiques chez l'homme suggèrent que la détérioration du muscle constitue un facteur de risque pour le développement de différentes maladies liées à l'âge, telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, les syndromes métaboliques... [19]. Les associations entre l'état fonctionnel, la demande métabolique et la masse musculaire avec la pathogenèse et la mortalité de ces maladies indiquent que le tissu musculaire est la clé de la régulation systémique du vieillissement [14].

Un aspect important du tissu musculaire est le fait qu'il peut agir comme une source endogène d'acides aminés pour la subsistance de la synthèse des protéines dans d'autres tissus, ce qui pourrait expliquer qu'une perte de masse musculaire entraîne un vieillissement systémique de l'organisme. Bien que les mécanismes qui régulent le vieillissement des tissus et leur relation avec la longévité et la survie de l'organisme ne soient pas clairs, on sait que l'intégrité musculaire est nécessaire au maintien de la physiologie du corps [14]. À son tour, on reconnaît l'importance d'une fonction mitochondriale normale dans l'homéostasie musculaire, mais il y a toujours des aspects importants de la biologie mitochondriale dont les mécanismes sont encore insaisissables, comme le contrôle de la qualité mitochondriale (mitophagie) ou de la dynamique mitochondriale [20].

En outre, des changements biochimiques et du métabolisme ont lieu dans les muscles au cours du vieillissement: la synthèse protéique mitochondriale et l'activité glycolytique et oxydative diminuent, il y a formation de dépôts d'ATP intracellulaire et une réduction de la capacité respiratoire d'environ 30% [18]. Aussi, le muscle squelettique semble jouer un rôle central dans la résistance à l'insuline et l'obésité. Avec la sarcopénie et le vieillissement, les taux circulants d'*IGF-1* sont réduits jusqu'à 70% et son expression dans le muscle squelettique diminue jusqu'à 45% chez l'homme [22]. On observe aussi une atténuation de l'expression des cibles de signalisation intracellulaires contrôlées par la voie IIS, qui comprend une réduction de l'activité *Akt*, *mTOR*, *4E-BP*... [23]. Cependant, de nombreuses études ont associé une réduction de la voie IIS avec une extension de la demi-vie et une amélioration de la santé de différents organismes modèles [24, 25, 26]. Autrement dit, les niveaux de signalisation IIS diminuent au cours du vieillissement normal ou prématuré, alors que, paradoxalement, une diminution constitutive de la voie IIS pourrait prolonger la longévité.

La voie IIS est la voie de contrôle du vieillissement conservée évolutive et parmi ses multiples cibles, on trouve la famille des facteurs de transcription *FOXO* et des complexes *mTOR*. Les *DILPs* (*Drosophila insulin-like peptides*) se lient au récepteur de l'Insuline/*IGF-1* (*InR*). La phosphorylation de son substrat *CHICO* conduit au recrutement et activation de *PI3K*, qui phosphoryle PIP_2 en PIP_3 , un événement inhibé par la phosphatase *PTEN*, qui

déphosphoryle PIP₃. Les niveaux accrus de PIP3 activent une cascade de kinases (dPDK et dAkt), qui à son tour phosphorylent et inactivent le facteur de transcription *FOXO*, en favorisant sa translocation du noyau au cytosol. Fait important, les gènes cibles de *FOXO* comprennent des gènes de réponse au stress et pro-longévité. En plus, il a été démontré que l'espérance de vie de *Drosophila* est prolongée lorsque les *DILPs* (principalement produits dans le cerveau et les tissu adipeux), le récepteur de l'insuline et ses substrats *CHICO* et *LNK* sont régulés négativement ou lorsque *PTEN* est positivement régulé [27].

1.4. *Drosophila melanogaster* comme modèle pour l'étude du vieillissement

Drosophila melanogaster est l'un des organismes modèles les plus utilisés dans la recherche. De plus, l'accès facile à la génétique de *D. melanogaster* a fait de ce modèle l'un des plus importants dans les études sur le vieillissement [28].

L'utilisation de *Drosophila* dans l'étude de la longévité et du vieillissement présente de nombreux avantages. Premièrement, les mouches ont une demi-vie relativement courte d'environ deux mois dans des conditions de laboratoire (25°C). Inversement, les mammifères ont une espérance de vie longue et variable, ce qui rend ce type d'étude difficile. En plus de cela, *D. melanogaster* est un modèle de maintenance simple, peu coûteux et facile à propager en culture, ce qui permet de réaliser les différentes expériences avec une taille d'échantillon relativement importante [29]. Le troisième avantage est le grand nombre de ressources génétiques et d'outils moléculaires qui existent chez la drosophile, y compris une grande bibliothèque publique de souches mutantes, des modèles knock-down de pratiquement tous les gènes, le séquençage complet de son génome, ou le système *UAS-GAL4* d'activation de l'expression génique. Toutes ces techniques permettent d'introduire des perturbations génétiques dans le génome de la drosophile et de les contrôler dans l'espace (tissu) et le temps (développement biologique) d'une manière précise.

Enfin, il convient de noter que les mammifères et la drosophile partagent un déclin fonctionnel similaire et dépendant de l'âge (réduction de la capacité locomotrice, capacités d'apprentissage, fonction sensorielle...), marqueurs clés pour étudier le vieillissement de notre modèle. De manière analogue, la mouche du vinaigre subit une accumulation de dommages oxydatifs dans les protéines, l'ADN et les mitochondries, et une détérioration progressive des tissus.

2. OBJECTIF

L'objectif principal de ce projet est l'étude de l'existence d'altérations systémiques dans la voie de signalisation de l'insuline chez des individus *Drosophila* âgés avec une fusion mitochondriale altérée dans le muscle. Pour ce faire, nous avons silencé l'expression d'*Opa1* et *Marf* (l'orthologue de *Mfn1* et *Mfn2* chez la drosophile) dans le tissu musculaire (en exprimant la protéine *GAL4* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de la myosine). Après, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la voie IIS (*Dilp2*, *Dilp6*, *InR*, *4E-BP*) ont été quantifiés par RT-qPCR à un âge avancé (65 jours) dans la tête, le thorax et l'abdomen (des régions corporelles enrichies respectivement en tissu nerveux, musculaire et adipeux).

Matériels et Méthodes

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Souches utilisées et maintien

Le Tableau M1 montre le nom, l'origine et la description des souches de *D. melanogaster* utilisées. Les mouches utilisées pour les expériences sont maintenues à 25°C, tandis que le stock de mouches est maintenu à 18°C. Les mouches sont cultivées dans de petits tubes en plastique avec environ 10 ml de nourriture. Les tubes des mouches utilisées pour les expériences sont changés tous les 2-3 jours. Toutes les expériences ont été faites avec des mâles de ces souches anesthésiés avec un système de CO₂, afin de pouvoir les manipuler.

Tableau M1. Caractéristiques des souches de *D. melanogaster* utilisées pour le projet.

Nom	Origine	Description/Genotype
<i>Oregon (Or)</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	Genotype sauvage
ARNi- <i>Marf</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (B#31157)	+/+ ; RNAi- <i>Marf</i> /RNAi- <i>Marf</i> (L'ARNi cible l'exon 2 du gène <i>Marf</i> , partagé par toutes les isoformes d'expression).
ARNi- <i>Opa1</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (B#32358)	+/+ ; RNAi- <i>Opa1</i> /RNAi- <i>Opa1</i> (L'ARNi cible l'exon 5 du gène <i>Opa1</i> , partagé par toutes les isoformes d'expression).
<i>Mhc-Gal4 ; UAS-Dcr</i>	Générée dans le laboratoire	<i>Mhc-Gal4/Mhc-Gal4 ; UAS-Dcr/UAS Dcr</i>

La méthode de préparation de 2 litres de nourriture ou milieu de culture pour les mouches est la suivante :

1. Mélanger les ingrédients suivants:

- 20 g d'agar
- 20 g de soja
- 120 g de farine de maïs
- 100 g de sucre

2. Chauffer 1,2 litre d'eau désionisée au micro-ondes (5 minutes à 800 W).

3. Ajouter le mélange préparé et 60 g de levure sèche à l'eau chauffée. Bien homogénéiser à l'aide d'un batteur électrique.

4. Stériliser le mélange homogénéisé dans l'autoclave.

5. Ajouter au mélange stérilisé 800 ml d'eau désionisée chauffée au préalable au micro-ondes (5 minutes à 800 W).

6. Ajouter 6 g de Nipagin (methyl 4-hydroxybenzoate, antifongique et antibactérien) dissous dans 20 ml d'éthanol 96° et 10 ml d'acide propionique (antifongique). Homogénéiser le mélange autoclavé, l'eau chaude et les antimicrobiens à l'aide du batteur électrique.

7. Dispenser environ 10 ml de milieu de culture dans les tubes en plastique, à l'aide de la pompe péristaltique *Dose it* (INTEGRA Biosciences AG – 7205 Zizers, Suisse). Couvrir les tubes avec une feuille et laisser reposer toute la nuit à température ambiante.

8. Le lendemain matin, couvrir les tubes avec des bouchons spéciaux anti-acariens et les stocker à 4°C pour les conserver.

3.2. Le système UAS-GAL4

Le système *UAS-GAL4* est un système binaire d'activation de l'expression génique largement utilisé chez *Drosophila* [30]. La protéine *GAL4* est un facteur de transcription de levure qui contient un domaine de liaison à l'ADN à son extrémité N-terminale et un domaine d'activation de la transcription à l'extrémité C-terminale. *GAL4* se lie à une séquence nucléotidique spécifique, appelée *UAS* (*upstream activating sequence*), un *enhancer* qui permet l'activation d'un promoteur basal situé en aval de la séquence *UAS*.

Il existe des lignées de *Drosophila* qui expriment *Gal4* sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu, et des lignées *UAS* qui permettent l'expression d'un gène d'intérêt. Lorsque ces lignées se croisent, les descendants expriment la protéine *GAL4*, qui se lie à la séquence *UAS* et active le gène d'intérêt dans le tissu pour lequel le promoteur est spécifique. Dans notre cas, *Gal4* est exprimé dans le tissu musculaire et on introduit les différents ARNi sous le contrôle de la séquence *UAS* (Figure M1).

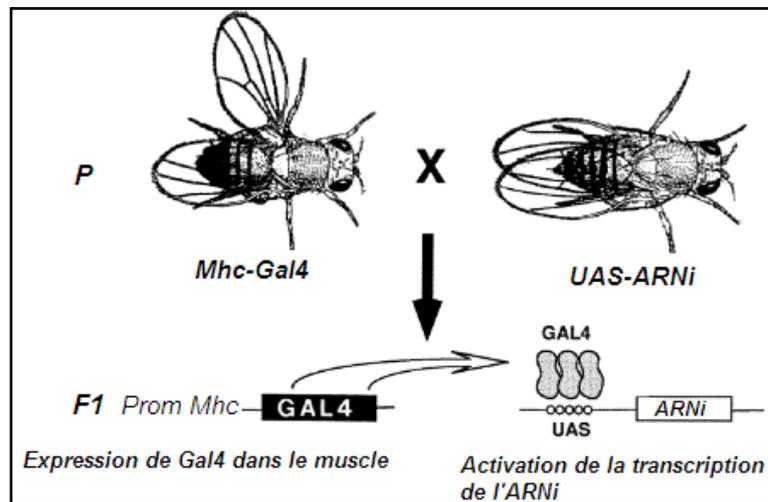


Figure M1. Croisement réalisé pour obtenir les mouches avec silencement d'*Opa1* et *Marf* dans le muscle. Les mâles descendants du croisement sont récupérés et cultivés jusqu'à l'âge de 65 jours. Adapté de Brand et Perrimon, 1993 [30].

Un des avantages de cette méthode d'expression est qu'elle permet d'étudier et de contrôler l'expression de n'importe quel gène dans le temps et l'espace en croisant des lignes conductrices (drivers), qui expriment *Gal4* sous le contrôle d'un promoteur connu, avec des lignées *UAS* effectrices/rapportrices. La capacité à activer la transcription, ainsi que le manque de cibles endogènes de la protéine *GAL4* chez la drosophile, font de ce système d'expression un outil génétique crucial pour l'étude des phénomènes biologiques. En même temps, c'est la marque de la génétique moderne chez la drosophile.

3.3. Méthodes moléculaires

Pour mesurer les niveaux d'expression des différents composants de la voie IIS et pour confirmer le silençage d'*Opa1* et *Marf*, nous avons utilisé la méthode de la RT-qPCR. Dans cette méthode, l'ARN total est d'abord transcrit en ADNc par la transcriptase inverse. L'ADNc est ensuite utilisé comme matrice pour la qPCR. L'amplification de l'ADNc est suivie grâce à l'incorporation d'un fluorochrome. La fluorescence est mesurée après chaque cycle d'amplification et on détermine le cycle à partir duquel la fluorescence passe une valeur seuil (C_s), que nous pouvons relier à la quantité initiale d'ADNc dans l'échantillon: plus il y en a, moins le nombre de cycles pour dépasser le seuil de fluorescence sera important, et vice-versa.

3.3.1. Extraction d'ARN

La méthode consiste en une séparation en trois phases du mélange tissulaire homogénéisé en utilisant comme réactifs le phénol et le chloroforme. Le mélange est séparé en une phase rouge (phénol-chloroforme, en bas), une interface avec l'ADN, et une phase incolore en haut, qui contient l'ARN. Le protocole utilisé pour l'extraction d'ARN à partir de 10 têtes, thorax ou abdomens de mouche est le suivant:

1. Ajouter 800 μL de Trizol™ (ThermoFisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA) aux mouches qui ont été préalablement anesthésiées ou congelées. Homogénéiser après avec un mortier. Le Trizol™ est une solution phénolique commerciale qui contient des sels chaotropiques permettant ainsi la dénaturation et précipitation des protéines.
2. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
3. Ajouter 160 μL de chloroforme, agiter pendant 15 secondes et incuber 3 minutes à température ambiante. Centrifuger à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le chloroforme permet de séparer la phase organique (phénol-chloroforme) et aqueuse.
4. Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube *Eppendorf* et ajouter 400 μL d'isopropanol pour faire précipiter l'ARN.
5. Laisser 10 minutes à température ambiante et centrifuger à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C.
6. Éliminer le surnageant, ajouter au culot 500 μL d'éthanol au 75% et centrifuger à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C afin de laver l'ARN et d'enlever les traces de phénol et chloroforme.
7. Éliminer le surnageant et laisser sécher le culot d'ARN à l'air (environ 25 minutes).
8. Ajouter au culot 8 μL d'eau sans nucléases et remettre en suspension le culot.
9. Incuber à 55 °C pendant 10 minutes afin de bien solubiliser le culot.
10. Éliminer l'ADN en traitant l'ARN avec DNase I – *Amplification Grade* (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, EUA):
 - Ajouter 1 μL de tampon de réaction 10X, 1 μL de DNase I et incuber à 37°C pendant 30 minutes. Température optimale parce que c'est l'enzyme est extrait du pancréas bovin.
 - Ajouter 1 μL de solution d'arrêt et incuber à 70°C pendant 15 minutes. La solution d'arrêt contient de l'EDTA (chélateur d'ions bivalents nécessaires pour l'activité enzymatique de la DNase). Le chauffage permet aussi de dénaturer les structures d'ARN en double brin.

Ensuite, l'ARN obtenu a été quantifié et sa pureté a été évaluée à l'aide du spectrophotomètre ND100 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA). La pureté de l'échantillon est déterminée par les rapports d'absorbance $A_{260/280}$ et $A_{260/230}$ (les protéines absorbent à 280 nm, les acides nucléiques à 260 nm et quelques composés tels que le phénol à 230 nm). Les rapports entre 1,7-1,9 sont considérés donc de bonne pureté.

3.3.2. RT-PCR

Pour transformer l'ARN extrait en ADNc nous avons utilisé le kit *qScript cDNA SuperMix* (Quantabio; Beverly, Massachusetts, EUA). Il s'agit d'une solution commerciale qui contient les concentrations optimisées de MgCl_2 (le magnésium est un cofacteur de l'enzyme), les dNTPs, la transcriptase, des inhibiteurs de ribonucléases et un mélange d'amorces au hasard et d'oligodTs. En suivant les recommandations du fabricant, les quantités de réactifs utilisées pour effectuer la réaction sont indiquées dans le Tableau M2. Le volume final de la réaction était de 10 μL . La réaction a été faite dans le thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems ; Foster City, Californie, EUA), en utilisant le programme suivant :

- Extension : 5 minutes à 25°C. Extension de l'oligodT et des amorces aléatoires pour éviter qu'ils se dissocient de la matrice lorsque la température est augmentée.
- Synthèse du cDNA : 30 minutes à 42°C, température optimale de la rétro transcriptase.

- **Terminaison** : 5 minutes à 85°C afin d'inactiver l'enzyme pour qu'elle n'interfère pas dans la qPCR.
- ∞ à 4°C pour éviter la dégradation du cDNA.

Tableau M2. Volumes et réactifs utilisés pour la RT-PCR.

Réactif	Volume (µL)
qScript cDNA SuperMix 5X	2
500 ng d'ARN matrice	Variable
Eau sans nucléases	Variable qsp 10 µL

3.3.3. PCR quantitative (qPCR)

La PCR en temps réel ou PCR quantitative est devenue une procédure bien établie pour la quantification absolue (avec une courbe standard) ou relative (en comparant avec un contrôle, comme nous avons fait) des niveaux d'expression génique. L'élément clé de cette méthode est sa capacité de détecter la quantité de produit de PCR après chaque cycle en mesurant la fluorescence.

Les qPCR ont été réalisées en utilisant *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Californie, EUA). Le SYBR Green™ se lie de manière non spécifique à l'ADN double brin (sillon mineur) et produit de la fluorescence (lorsqu'il n'est pas lié, la fluorescence n'est pas significative). Ce fluorochrome n'est pas spécifique puisqu'il se lie à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, y compris les dimères d'amorces. L'utilisation de SYBR Green™ implique donc une conception très soignée des amorces afin d'éviter l'amplification des dimères d'amorces et de l'ADN génomique. Ceci a été évité en traitant les échantillons avec de la DNase avant d'effectuer la RT-PCR et en concevant les amorces à cheval entre deux exons différents. La séquence des amorces a été conçue avec l'outil *Roche Universal Probe Library Assay Design Center* et est indiquée dans le Tableau M3.

Tableau M3. Séquence des amorces utilisées pour la PCR quantitative.

Gène	Séquence des amorces	Gène	Séquence des amorces
<i>Rp49</i>	5'-CGTTTACTGCGGCGAGAT-3' 5'-GCGCTCGACAATCTCCTT-3'	<i>Dilp2</i>	5'-ATCCCGTGATTCCACACAAG-3' 5'-GCGGTTCCGATATCGAGTTA-3'
<i>Opa1</i>	5'-CATGGCACACTACTTTTCCTGA-3' 5'-TGCTACTAGCCGAGGAGCTAAT-3'	<i>Dilp6</i>	5'-CCCTTGCGGATGTATTTCC-3' 5'-CAGTACTGCAAGAGCTCCCTGT-3'
<i>Marf</i>	5'-CGCCAGTTGTTTGATGTTCA-3' 5'-ATTGGGCACACCACGAAT-3'	<i>4ebp</i>	5'-CCAGATGCCCGAGGTGTA-3' 5'-AGCCCGCTCGTAGATAAGTTT-3'
<i>InR</i>	5'-CCGGGATTACTGTACTGAACCT-3' 5'-CGCCTGCTAAAGGATCTGA-3'		

Le Tableau M4 montre les volumes des réactifs utilisés pour chaque réaction de 10 µL. Pour réaliser cette qPCR nous avons préparé le mix contenant tous les réactifs du Tableau M4, sauf le cDNA, dans des tubes *Eppendorf* opaques (pour éviter la désactivation non radioactive du fluorochrome). Après, nous avons distribué 8 µl de mix et 2 µl de cDNA dans des plaques *Corning™* 96 puits (*Axygen™*, ThermoFisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA).

Tableau M4. Volume des réactifs utilisés pour les PCR quantitatives.

Réactif	Volume (µL)
Amorce directe 10 µM	0,5
Amorce reverse 10 µM	0,5
ADNc (dilution 1:10 du produit de la RT-PCR, dilution optimisée dans le laboratoire au préalable)	2
SYBR Green Master Mix (ADNpol, MgCl ₂ , dNTPs, SYBR Green™)	4
Eau Ultra Pure (<i>PCR Grade</i>)	3

Le système de détection de fluorescence utilisé est le LightCycler480 (Roche; Basilea, Suisse), dans lequel la réaction a été réalisée en suivant le programme ci-dessous :

1. Pré-incubation: 5 minutes à 95°C pour activer l'ADN polymérase *FastStart Taq* et dénaturer l'ADN
2. 40 cycles d'amplification
 - 10 secondes à 95°C : dénaturation des chaînes d'ADN double brin formées dans chaque cycle, qui serviront de matrice pour les cycles suivants.
 - 10 secondes à 58°C : *annealing* des amorces à une température environ 5°C inférieur à la température moyenne de fusion des amorces utilisées. Cette température a été optimisée pour la séquence de nos amorces.
 - 10 secondes à 72°C : extension du brin matrice à la température optimale de travail de l'ADN polymérase.
3. Curve de fusion (*Melting curve*) pour identifier le produit de PCR généré (T_m spécifique de chaque produit). Cela permet donc d'analyser la spécificité des amorces et d'exclure les échantillons dans lesquels il y a eu formation et quantification de dimères d'amorces (dont la température de fusion est inférieure à celle du produit de PCR amplifié).
 - 5 secondes à 95°C pour réactiver la polymérase.
 - Gradient de température 55°C-95°C pendant une minute (4,4°C/seconde).
Quand les doubles brins d'ADN se séparent à cause de la température, la fluorescence diminue parce que le SYBR Green™ ne se lie plus à l'ADN. Le thermocycleur permet d'obtenir le point à partir duquel la fluorescence diminue de manière significative suite à une augmentation de température (T_m).

Tous les échantillons ont été analysés en triple et l'expression des gènes d'intérêt a été calculée par la méthode de quantification relative $2^{-\Delta\Delta C_s}$ [31], en normalisant les niveaux d'expression par rapport à ceux du gène de ménage *Rp49* dont l'expression est constitutive. La méthode $2^{-\Delta\Delta C_s}$ permet de comparer le C_s du gène d'intérêt avec le gène de référence en utilisant l'équation ci-dessous. Le premier ΔC_s correspond à la différence de C_s entre le gène d'intérêt et le gène de référence pour chaque genotype/groupe donné. Le deuxième ΔC_s est calculé en faisant la différence entre groupes.

$$\Delta\Delta C_s = (C_{s_{\text{gène intérêt}}} - C_{s_{\text{gène référence}}})_{\text{genotype d'intérêt}} - (C_{s_{\text{gène intérêt}}} - C_{s_{\text{gène référence}}})_{\text{genotype contrôle}}$$

Le taux de changement de l'expression génique ou fold change (FC, en unités arbitraires) peut donc être déterminé en calculant $2^{-\Delta\Delta C_s}$. Pour appliquer cette formule nous assumons que l'efficacité de la réaction est similaire pour les gènes d'intérêt et de référence. La méthode $2^{-\Delta\Delta C_s}$ suppose aussi une efficacité de 100% pour tous les échantillons, mais il serait intéressant de vérifier l'efficacité pour chaque gène à l'aide d'une courbe standard (en faisant des dilutions d'une concentration d'ADNc connu et en représentant le log de la concentration d'ADNc en fonction du C_s obtenu).

3.3. Méthodes statistiques et graphiques

Les représentations graphiques des résultats ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, Californie), tandis que pour faire les statistiques nous avons utilisé Excel (Microsoft, Albuquerque). Le niveau moyen d'expression génique (*fold change*) a été comparé entre les différents groupes avec un test-t de comparaison de moyennes et la P-valeur a été calculée pour voir la significativité des résultats.

Résultats et Discussion

4. RÉSULTATS

4.1. Validation de l'extinction génique d'*Opa1* et *Marf* dans le tissu musculaire

L'expression des gènes *Marf* et *Opa1* a été silencée dans le tissu musculaire de la drosophile grâce à l'expression d'un petit ARN en épingle à cheveux (*shRNA*) en utilisant le système *UAS ARNi x Mhc-GAL4*. Le *shRNA* exprimé est clivé par la protéine *DICER* du complexe *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) ce qui génère des fragments des petits ARN de silençage (*siRNA*). Les *siRNA* sont pris en charge par la protéine *Argonaute 2*, une RNase qui traite et clive l'ARN messager complémentaire aux fragments *siRNA* générés à partir du *shRNA*, ce qui conduit au silençage (diminution de l'expression) du gène cible.

Pour confirmer la diminution de l'expression de *Marf* et *Opa1*, les niveaux d'expression relatifs des transcrits de ces deux gènes ont été quantifiés par RT-qPCR, comme expliqué dans la section *Matériels et Méthodes*. La Figure R1 montre les résultats de l'expression relative des transcrits de *Marf* et *Opa1* pour les génotypes témoin (CTR), avec *Marf* silencé (ARNi-*Marf*) et avec *Opa1* silencé (ARNi-*Opa1*). La normalisation des niveaux d'expression en RT-qPCR nécessite une analyse comparative par rapport aux gènes dont l'expression ne change pas ou reste relativement stable dans les conditions de l'étude (ici, Rp49). En raison de la dispersion des résultats de l'expression relative chez les individus nés de différents croisements, les résultats sont présentés par réplicat biologique.

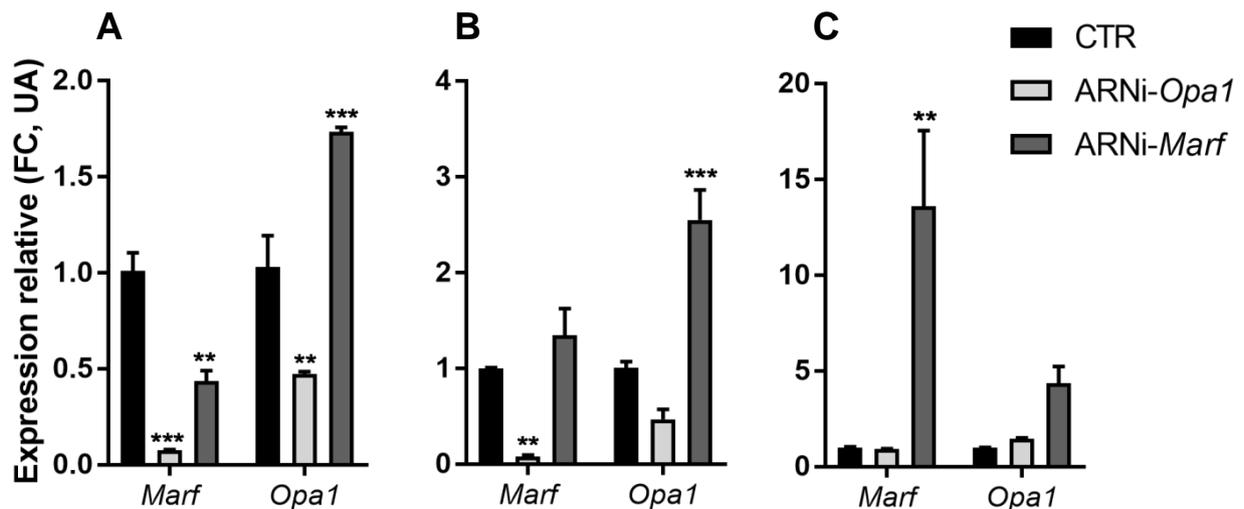


Figure R1. Validation du silençage d'*Opa1* et *Marf* dans le thorax, la région corporelle avec le plus de tissu musculaire, par RT-qPCR. On observe les niveaux d'expression relative (*Fold Change* en unités arbitraires) d'*Opa1* et *Marf* par rapport au contrôle (CTR), calculés par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ et analysés par t-test (*p-valeur < 0.05; ** < 0,01; *** < 0,001). En raison de la faible reproductibilité du silençage dans les trois réplicats biologiques, nous montrons les résultats obtenus pour chacun des trois réplicats biologiques séparément (chacun d'eux obtenu à partir du thorax de 10 individus) : croisement N₁ (A), N₂ (B) et N₃ (C).

Dans le cas du réplicat N₁ (Figure R1A), nous observons une diminution significative de l'expression de *Marf* par rapport au contrôle dans le génotype ARNi-*Marf* et une diminution significative des niveaux d'expression d'*Opa1* dans le génotype ARNi-*Opa1*, ce qui permet de valider l'extinction/silençage dans le tissu musculaire de ces individus. Fait intéressant, l'extinction d'*Opa1* conduit à une diminution très significative de l'expression de *Marf*, et l'extinction de *Marf* entraîne une augmentation très significative de l'expression d'*Opa1*.

D'autre part, les réplicats N₂ (Figure R1B) et N₃ (Figure R1C) ne montrent pas une extinction efficace des gènes *Marf* ou *Opa1*. En fait, les changements significatifs observés dans le réplicat N₂ sont une réduction des niveaux d'expression de *Marf* lorsqu'*Opa1* est silencé, et une augmentation significative de l'expression de *Marf* après avoir silencé *Opa1*.

Étonnamment, les niveaux d'expression de *Marf* augmentent significativement dans le génotype ARNi-*Marf* dans le réplicat N₃. Ce résultat est encore plus surprenant si l'on tient compte du fait que les niveaux d'expression de *Marf* avaient été préalablement quantifiés dans le laboratoire chez des individus descendant du même croisement à 30 jours, et il y avait une diminution significative de l'expression du gène *Marf*. Ces résultats seront discutés plus en détail dans la section *Discussion*.

Malgré tout, différentes études montrent qu'une extinction de l'expression génique pro-fusion conduit à un stress mitochondrial et à une modification morphologique des mitochondries, qui apparaissent plus fragmentées [3, 32]. Comme les résultats à 30 jours nous permettent de confirmer que l'insertion de la lignée UAS-ARNi conduit à un silençage efficace et donc à un réseau de mitochondries plus fragmentées, nous avons décidé d'étudier l'existence d'altérations systémiques dans la voie IIS.

4.2. Altérations de la voie de signalisation Insuline/IGF-1

Compte tenu des changements métaboliques observés dans l'étude métabolomique réalisée dans le laboratoire (résultats non publiés), qui suggère une mauvaise utilisation des substrats énergétiques, et de l'existence d'études antérieures qui montrent qu'une perturbation de la dynamique mitochondriale peut entraîner un déséquilibre de la signalisation insuline/IGF-1, nous avons mesuré les niveaux d'expression génique de certains composants de la voie IIS : les peptides analogues à l'insuline *Dilp2* et *Dilp6* ont été mesurés dans la tête (puisque leur synthèse chez la drosophile survient principalement dans le cerveau); l'expression du récepteur de l'insuline *InR* et de la protéine de liaison au facteur d'élongation *4e*, *4E-BP*, a été mesurée dans la tête, le thorax et l'abdomen.

Les résultats d'expression relative de *Dilp2*, *Dilp6*, *InR* et *4E-BP* au niveau de la tête (représentatif du tissu nerveux) sont présentés dans la figure R2. En ce qui concerne les peptides analogues à l'insuline, on observe que le silençage d'*Opa1* conduit à une diminution très significative des niveaux de *Dilp2* et *Dilp6*, et l'extinction de *Marf* entraîne une baisse très significative des taux de *Dilp2*, le principal peptide d'insuline produit dans le cerveau de *Drosophila*. En outre, nous observons une augmentation significative de l'expression de *4E-BP* et *InR*. *4E-BP* et le récepteur de l'insuline sont tous les deux des marqueurs de suppression de la signalisation Insuline/IGF-1, puisqu'ils sont des gènes cibles de *FOXO* qui s'expriment en suivant un mécanisme de rétrocontrôle négatif: plus la signalisation Insuline/IGF-1 est puissante, moins les niveaux d'expression de ces gènes sont importants.

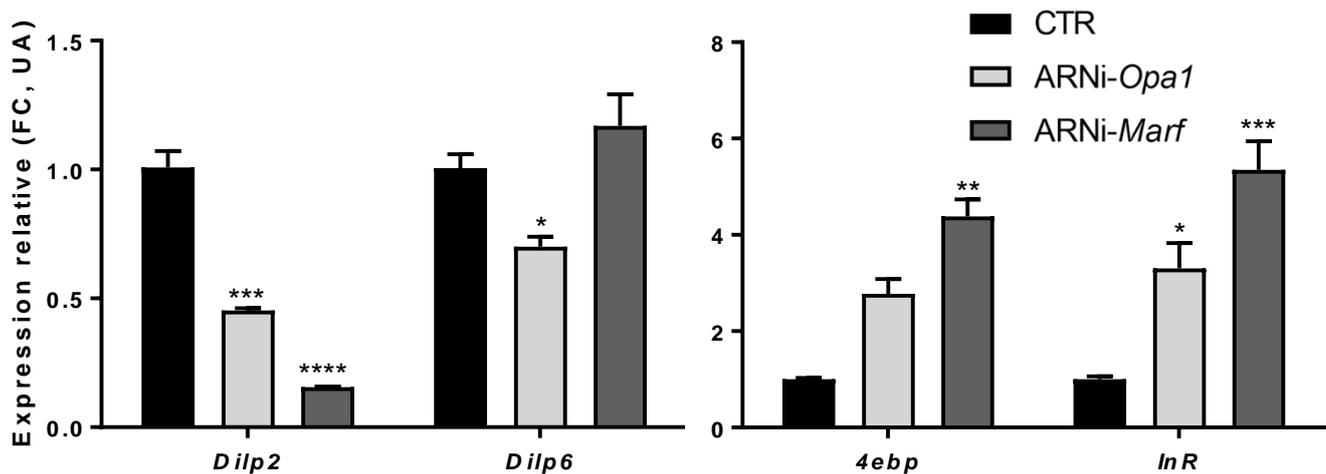


Figure R2. Niveaux d'expression relative des gènes Dilp2, Dilp6, 4E-BP et InR dans la tête (tissu nerveux) des souches contrôle (CTR), avec expression d'Opa1 silencieuse, et avec expression de Marf silencieuse (ARNi-Opa1 et ARNi-Marf, respectivement). On montre le fold change en unités arbitraires par rapport au contrôle calculé par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et analysé avec un test-t de Student (* indique valeur-p < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001).

Les niveaux d'expression du récepteur de l'insuline et de 4E-BP ont également été quantifiés dans le thorax et l'abdomen, et les résultats obtenus sont présentés dans la figure R3. Les individus chez lesquels l'extinction de Marf a été réalisée montrent une augmentation très significative de l'expression génique des deux marqueurs de suppression de la voie IIS dans le thorax, tandis qu'il n'y a pas de changements significatifs dans l'abdomen, bien qu'il y ait une légère tendance à surexpression de 4E-BP. D'autre part, quand l'expression d'Opa1 est silencieuse, aucune altération significative de la voie IIS n'est observée dans le thorax, mais il y a une augmentation très significative de l'expression de InR dans l'abdomen.

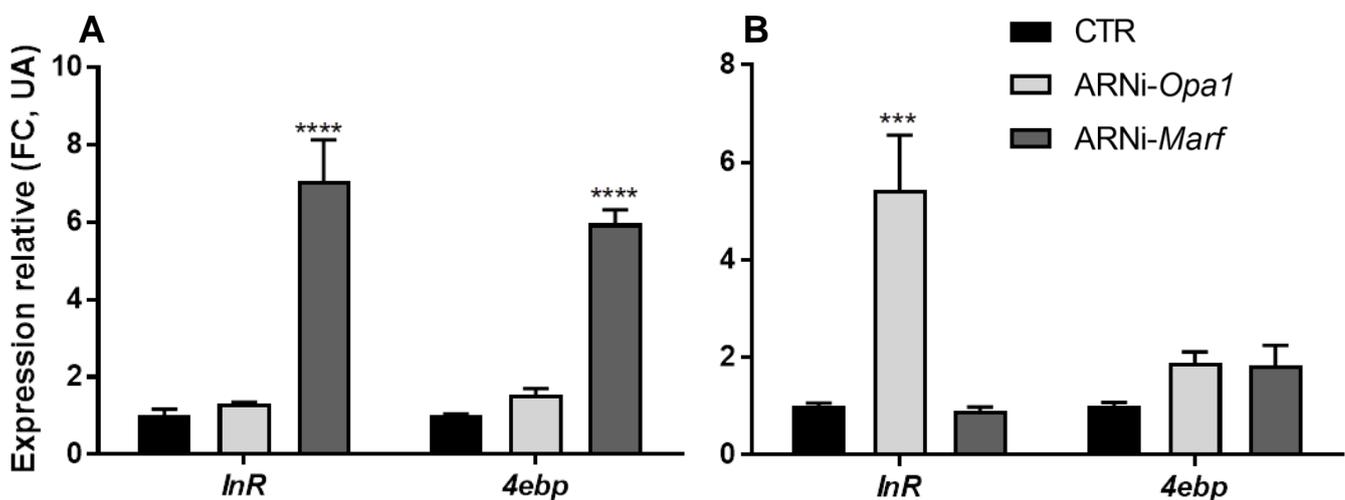


Figure R3. Niveaux d'expression relative des gènes 4E-BP et InR dans le thorax (A) et l'abdomen (B) des souches contrôle (CTR) et avec silencing d'Opa1 et Marf (ARNi-Opa1 et ARNi-Marf, respectivement). On montre le fold change en unités arbitraires par rapport au contrôle calculé par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et analysé avec un test-t de Student (* indique valeur-p < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001).

5. DISCUSSION

La mesure de l'expression génique de *Marf* et *Opa1* à 65 jours a donné des résultats peu reproductibles. Les résultats obtenus dans notre laboratoire (non publiés) indiquent que les différences du profil métabolomique des différents génotypes sont clairement perceptibles à 30 jours, tandis qu'à 65 jours, les résultats sont beaucoup moins évidents.

Au vue de l'hétérogénéité des résultats observés, nous avons proposé l'existence d'une perte physiologique de masse musculaire dépendante de l'âge ou d'autres altérations systémiques dues au vieillissement naturel des individus qui impliquerait des changements métaboliques, biochimiques et de signalisation non liés à l'altération de la fusion mitochondriale dans le muscle. Pour vérifier la perte éventuelle de masse musculaire, une étude de pesée des trois génotypes a été réalisée à 7 et 30 jours, bien que les résultats n'aient pas été concluants.

De plus, il est possible que ce que nous voyons soit un effet de masquage du reste de tissus dans lesquels l'expression d'*Opa1* et *Marf* n'a pas été silencée, car la séparation de trois parties du corps (tête, thorax et abdomen) est une approche qui permet d'enrichir l'échantillon dans un type de tissu, mais il convient de noter que le thorax contient d'autres tissus (conjonctifs, nerveux et épithéliaux, qui forment notamment la cuticule et qui rendent le processus d'extraction de l'ARN compliqué).

Pour éviter tout risque de masquage des autres tissus sur le tissu musculaire, nous avons essayé de silencer l'expression d'*Opa1* et *Marf* de façon ubiquitaire (en exprimant la protéine *GAL4* dans tous les tissus – en croisant les lignées UAS-ARNi avec une lignée Act5c-GAL4, qui exprime *Gal4* sous le contrôle du promoteur de l'actine (Act5C)). Cependant, nous avons observé que l'extinction ubiquitaire de l'expression d'*Opa1* est mortelle et produit arrêt du développement au stade larvaire, ce qui rend impossible l'obtention d'individus adultes. Il a également été proposé une mesure des niveaux d'expression des protéines *OPA1* et *MARF* par *Western Blot*, mais il n'existe pas d'anticorps anti-*MARF* ou anti-*OPA1* spécifiques de *Drosophila*.

De manière intéressante, on peut observer qu'une extinction de l'expression génique d'*Opa1* entraîne une diminution significative de l'expression de *Marf*, tandis que la diminution de l'expression génique de *Marf* entraîne une augmentation de l'expression d'*Opa1*. Ces données suggèrent l'existence de mécanismes compensatoires de régulation croisée. Notre hypothèse est qu'*OPA1* est un puissant régulateur positif de l'expression de *Marf*, alors que *MARF* inhibe faiblement l'expression d'*Opa1*. La figure D1 schématise ce modèle que nous avons proposé.

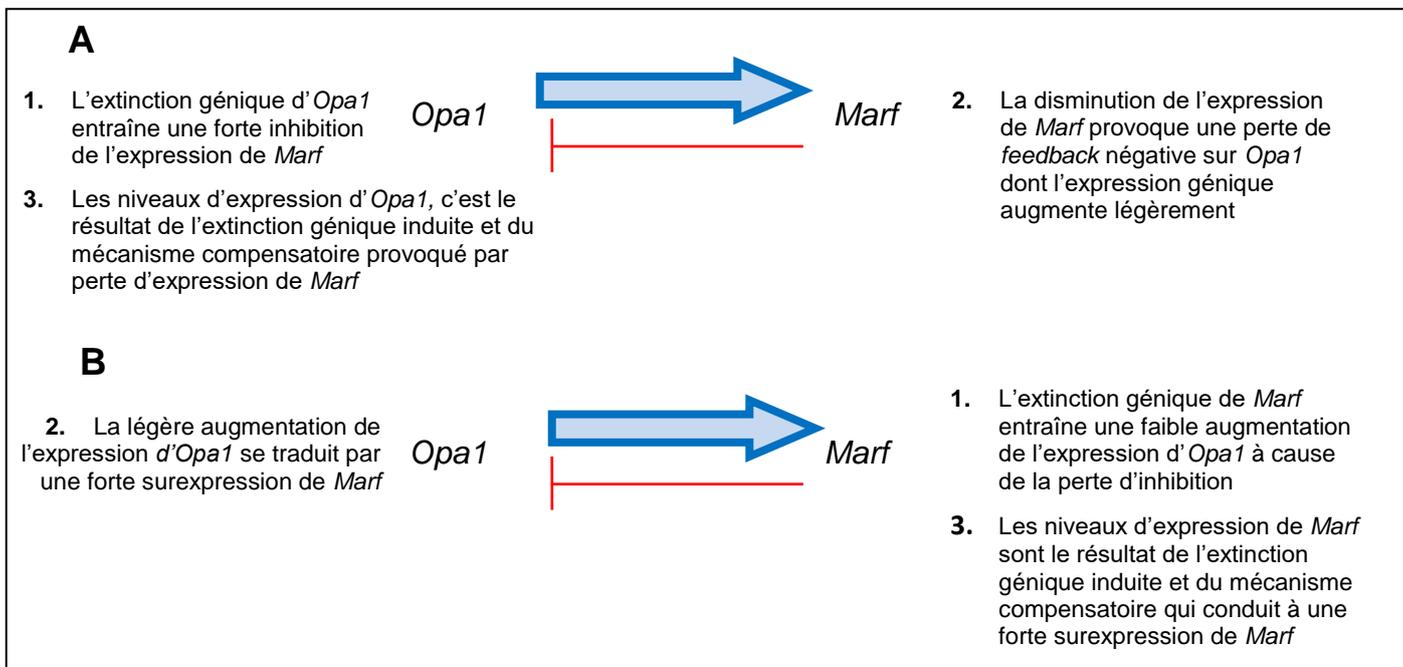


Figure D1. Schéma du modèle de régulation croisée entre *Opa1* et *Marf*. (A) Explication possible des niveaux d'expression de *Opa1*: La diminution d'*Opa1* génère une forte diminution des niveaux d'expression de *Marf*, qui à son tour se traduit par un mécanisme compensatoire de légère sur-régulation de *Opa1*. Les niveaux d'expression d'*Opa1* sont donc le résultat de l'extinction induite et des mécanismes de compensation endogènes dus à la perte de *Marf*. (B) Explication possible des niveaux d'expression de *Marf*: Lors de l'extinction de *Marf*, il y a une perte légère d'inhibition de l'expression d'*Opa1*, qui se traduit par une forte surexpression de *Marf*. Les niveaux d'expression de *Marf* résultent du silençage ciblé et des mécanismes de compensation naturels par perte d'inhibition sur *Opa1*.

D'autre part, nos résultats montrent une diminution significative de la signalisation de l'insuline: dans la tête, il y a une diminution très significative de la production de peptides analogues à l'insuline; dans le thorax et l'abdomen, nous avons observé une augmentation de l'expression des marqueurs de suppression de la signalisation Insuline/IGF-1. Même s'il semble que l'extinction génique d'*Opa1* a un impact plus prononcé au niveau de l'abdomen (représentatif du tissu adipeux), et que celle de *Marf* affecte de façon plus évidente au thorax (tissu musculaire), dans les deux cas on observe une tendance générale à la surexpression de ces marqueurs de suppression: *InR* et *4E-BP*.

Ces résultats confirment l'existence de modifications systémiques de la voie de signalisation insuline/IGF-1 chez les individus qui ont une fusion mitochondriale altérée dans le muscle et qui présentent une durée de vie majeure. Nous avons observé donc une communication intertissulaire qui pourrait être à l'origine des changements métaboliques observés dans le profil métabolomique de ces individus et qui pourraient cause le phénotype survivant observé.

Il existe différentes études qui prouvent l'implication de la dysfonction mitochondriale dans plusieurs altérations métaboliques, comme dans la résistance à l'insuline, bien que ces mécanismes ne semblent pas clairs [3]. Comme le quotient/ratio respiratoire (taux de production de CO₂ par rapport à la consommation d'oxygène) peut déterminer l'utilisation des sucres ou des lipides en tant que substrat de l'oxydation, et la dynamique mitochondrial est un des processus clé pour l'homéostasie respiratoire, une fusion mitochondriale modifiée pourrait se traduire par une diminution de l'efficacité respiratoire, entraînant ainsi une

perturbation du ratio respiratoire, de la production de ROS et des niveaux énergétiques, ce qui conduirait à un déséquilibre de la voie IIS [11].

L'oxydation des acides gras conduit à une accumulation d'acétyl-CoA, NADH et ATP, qui sont des inhibiteurs allostériques de la pyruvate déshydrogénase (*PDH*), le complexe enzymatique qui couple la glycolyse et la respiration mitochondriale. En plus, ces effecteurs allostériques peuvent activer une famille de kinases qui phosphorylent *PDH* en inactivant ainsi l'activité catalytique du complexe [33]. Ainsi, ce phénomène conduirait à l'accumulation de pyruvate, comme observé dans l'étude métabolomique. La diminution de la glycolyse et glycogénèse pourrait être la conséquence d'une atténuation de la voie IIS en réponse à une dynamique mitochondriale déséquilibrée, puisque l'action hypoglycémiant de l'insuline stimule ces deux processus.

Bien qu'il soit nécessaire une étude plus profonde sur la signalisation rétrograde, il existe plusieurs mécanismes par lesquels un stress mitochondrial peut déclencher une réponse nucléaire. Parmi les processus de communication mitochondriale-noyau nous trouvons la mitophagie, l'atténuation de la traduction, la voie UPR^{mt} et la voie UPR^{am} mais ces mécanismes ne sont pas complètement compris. En outre, il est également nécessaire d'élargir les connaissances sur les mécanismes de la signalisation intertissulaire afin de répondre à la façon dont la perturbation de la fusion mitochondriale dans le tissu musculaire conduit aux changements neurohormonaux observés. Il est important de noter ici la valeur des modèles animaux dans la recherche biomédicale, puisque ces mécanismes de communication systémique ne sont pas reproductibles *in vitro*.

Au-delà des changements métaboliques, une caractéristique des individus *Drosophila* avec une extinction de l'expression génique de *Marf* et *Opa1* dans le muscle est une extension de la durée de vie, qui est probablement due à la perte partielle de la signalisation Insuline/IGF-1. Dans les paragraphes suivants, nous essayons de résumer certains des mécanismes par lesquels une descente de la voie IIS se traduit par un vieillissement plus lent. Dans le cadre théorique classique, une réduction de la voie IIS entraîne une réduction de l'activité mitochondriale. La phosphorylation oxydative du glucose diminue et le flux d'électrons de la chaîne de transport électronique aussi. Ainsi, la production de ROS est beaucoup plus faible et les dommages cellulaires associés sont minimisés.

En plus, cette atténuation de la signalisation insulinaire pourrait entraîner une réduction des taux circulants de sucres, car l'action hormonale de l'insuline stimule la mobilisation et utilisation des sucres comme substrat énergétique. On sait qu'un taux élevé de sucres circulants peut conduire à une glycation des protéines, qui se traduit par différentes pertes fonctionnelles. Comme Otin et ses collègues ont expliqué [1], le phénomène de la glycation protéique est une caractéristique importante du processus de vieillissement, de la même manière qu'on trouve une augmentation de l'inflammation systémique. À cet égard, les produits finaux de glycation avancée (AGEs) exercent leur fonction délétère non seulement *per se*, mais ils peuvent interagir aussi avec des récepteurs spécifiques de type immunoglobuline (RAGEs) et stimuler plusieurs voies de transduction de signal (MAPKs, ERK...), ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa-B (NFkB), qui contrôle l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires et à la génération de stress

oxydatif par différents mécanismes : activation de NOX (NADPH oxydase), diminution de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)... [34]

En outre, une diminution de la signalisation insulinique entraînerait une surexpression des gènes cibles de *FOXO*, fortement impliqués dans le contrôle du vieillissement fonctionnel par différentes voies: réparation de l'ADN, réponse au stress oxydatif, maintien de la structure nucléaire, contrôle du cycle cellulaire. ... [35]

Pour finir, certaines études ont indiqué que la signalisation *FOXO/4E-BP* dans les muscles de la drosophile régule la protéostase systémique au cours du vieillissement. [19]. Il est également connu qu'une augmentation de l'activité du facteur de transcription *FOXO* et sa cible *Thor/4E-BP* est suffisante pour retarder le vieillissement et préserver la fonction musculaire grâce à la stimulation du système autophagie/lysosome qui élimine les agrégats de protéines endommagées. Bien que d'autres études soient nécessaires dans ce domaine, Demontis et ses collègues [19] ont proposé que la signalisation *FOXO* dans le muscle peut activer l'expression de *4E-BP* dans d'autres tissus, et que l'extension de la longévité viendrait par une diminution de l'apport en nutriments. L'activation de *FOXO* dans le muscle conduirait à une augmentation de la sensation nutritionnelle via activation transcriptionnelle de gènes pro-satiété, ce qui diminuerait la sécrétion d'insuline. Les faibles niveaux d'insuline seraient donc les responsables de l'extension systémique du signal et de la réduction de la vitesse de vieillissement fonctionnel de l'organisme.

Conclusions

6. CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer des résultats obtenus dans ce projet sont les suivantes:

1. Les drosophiles à 65 jours présentent un vieillissement naturel qui entrave la validation de l'extinction génique dans le tissu musculaire.
2. L'extinction (knock-down) de *Marf* dans le tissu musculaire de *Drosophila* a des effets significatifs sur l'expression d'*Opa1*, et vice versa. Ce travail nous a permis de proposer un modèle de régulation croisée de l'expression génique de *Marf* et *Opa1*: les résultats obtenus suggèrent qu'*Opa1* est un puissant activateur de l'expression du gène *Marf*, et que *Marf* peut inhiber plus faiblement l'expression d'*Opa1*.
3. Les individus *Drosophila* avec une altération de la fusion mitochondriale dans le tissu musculaire présentent des altérations systémiques dans la voie de signalisation insuline/IGF-1 à l'âge de 65 jours. Nos résultats suggèrent que l'atténuation de la voie IIS conduit à des changements métaboliques et de signalisation qui sont bénéfiques et prolongent la vie moyenne de l'organisme.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer de los resultados obtenidos en este proyecto son las siguientes :

1. Las *Drosophila* a una edad de 65 días presentan un envejecimiento natural que pone dificultad la validación del silenciamiento génico en el tejido muscular.
2. El silenciamiento génico (knock-down) de *Marf* en el tejido muscular de *Drosophila* presenta efectos significativos en la expresión de *Opa1*, y viceversa. Este trabajo nos ha permitido proponer un modelo de regulación cruzada de la expresión génica de *Marf* y *Opa1*: los resultados obtenidos sugieren que *Opa1* es un potente activador de la expresión del gen *Marf*, y que *Marf* puede inhibir más débilmente la expresión de *Opa1*.
3. Los individuos *Drosophila* con una alteración de la fusión mitocondrial en el tejido muscular presentan alteraciones sistémicas en la vía de señalización Insulina/IGF-1 a una edad de 65 días. Nuestros resultados sugieren que la atenuación de la vía IIS conduce a cambios metabólicos y de señalización que son beneficiosos y prolongan la vida media del organismo.

Bibliographie

7. BIBLIOGRAPHIE

1. López-Otín, Carlos et al. "The Hallmarks of Aging." *Cell* 6 June 2013. *Cell*. Web.
2. Chaudhari, Snehal N., and Edward T. Kipreos. "Increased Mitochondrial Fusion Allows the Survival of Older Animals in Diverse *C. Elegans* Longevity Pathways." *Nature Communications* 8.1 (2017): n. pag. *Nature Communications*. Web.
3. Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano. "Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease." *Physiological Reviews* 89.3 (2009): 799–845. *Physiological Reviews*. Web.
4. Sebastian, D. et al. "Mitofusin 2 (Mfn2) Links Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Function with Insulin Signaling and Is Essential for Normal Glucose Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.14 (2012): 5523–5528. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Web.
5. Halliwell, Barry, and Matthew Whiteman. "Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean?" *British Journal of Pharmacology* May 2004: 231–255. *British Journal of Pharmacology*. Web.
6. Knott, Andrew B. et al. "Mitochondrial Fragmentation in Neurodegeneration." *Nature Reviews Neuroscience* July 2008: 505–518. *Nature Reviews Neuroscience*. Web.
7. Itoh, Kie et al. "Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration." *Trends in Cell Biology* Feb. 2013: 64–71. *Trends in Cell Biology*. Web.
8. Zorzano, A et al. "Dinámica Mitocondrial y Sus Implicaciones En La Desregulación Metabólica y En La Neurodegeneración." *Institute for research in biomedicine* 34.12 (2014): 127–129. *Institute for research in biomedicine*. Web.
9. Del Amo, Víctor López et al. "Mitochondrial Defects and Neuromuscular Degeneration Caused by Altered Expression of *Drosophila* Gdap1: Implications for the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy." *Human Molecular Genetics* 24.1 (2015): 21–36. *Human Molecular Genetics*. Web.
10. López del Amo, Víctor et al. "A *Drosophila* Model of GDAP1 Function Reveals the Involvement of Insulin Signalling in the Mitochondria-Dependent Neuromuscular Degeneration." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1863.3 (2017): 801–809. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Web.
11. Muoio, Deborah M. "Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock." *Cell* 4 Dec. 2014: 1253–1262. *Cell*. Web.
12. Harman, Denham. "Free Radical Theory of Aging." *Mutation Research/DNAging* 275.3–6 (1992): 257–266. *Mutation Research/DNAging*. Web.
13. Owusu-Ansah, Edward, Wei Song, and Norbert Perrimon. "Muscle Mitohormesis Promotes Longevity via Systemic Repression of Insulin Signaling." *Cell* 155.3 (2013): n. pag. *Cell*. Web.
14. Tapia, Andrea. (2016). *Implicaciones de la dinámica mitocondrial en el envejecimietno y sus estudio a través de la metabólica: Drosophila melanogaster como organismo modelos* (Trabajo Final de Máster). Universitat de València, València.
15. Seo, Arnold Y et al. "New Insights into the Role of Mitochondria in Aging: Mitochondrial Dynamics and More." *J. Cell. Sci.* 123.Pt 15 (2010): 2533–2542. *J. Cell. Sci.* Web.
16. Reznick, Richard M. et al. "Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis." *Cell Metabolism* 5.2 (2007): 151–156. *Cell Metabolism*. Web.
17. Terman, Alexei et al. "Mitochondrial Turnover and Aging of Long-Lived Postmitotic Cells: The Mitochondrial–Lysosomal Axis Theory of Aging." *Antioxidants & Redox Signaling* 12.4 (2010): 503–535. *Antioxidants & Redox Signaling*. Web.

18. Volpi, E, R Nazemi, and S Fujita. "Muscle Tissue Changes with Aging." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7.4 (2004): 405–410. Web.
19. Demontis, Fabio et al. "The Influence of Skeletal Muscle on Systemic Aging and Lifespan." *Aging Cell* Dec. 2013: 943–949. *Aging Cell*. Web.
20. Gouspillou Gilles, Hepple Russell T. "Editorial: Mitochondria in Skeletal muscle health, aging and diseases". *Frontiers in Physiology*, vol. 7, issue OCT (2016) Published by Frontiers Media S.A. Web.
21. Putti, Rosalba et al. "Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics and Morphology in High Fat Diet Induced Obesity and Insulin Resistance: Focus on Dietary Fat Source." *Frontiers in Physiology* 6.January (2015): 1–8. *Frontiers in Physiology*. Web.
22. Léger, Bertrand et al. "Human Sarcopenia Reveals an Increase in SOCS-3 and Myostatin and a Reduced Efficiency of Akt Phosphorylation." *Rejuvenation Research* 11.1 (2008): 163–175B. *Rejuvenation Research*. Web.
23. Sharples, Adam P. et al. "Longevity and Skeletal Muscle Mass: The Role of IGF Signalling, the Sirtuins, Dietary Restriction and Protein Intake." *Aging Cell* 14.4 (2015): 511–523. *Aging Cell*. Web.
24. Clancy, D. J. et al. "Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein." *Science* 292.5514 (2001): 104–106. *Science*. Web.
25. Holzenberger, Martin et al. "IGF-1 Receptor Regulates Lifespan and Resistance to Oxidative Stress in Mice." *Nature* 421.6919 (2003): 182–187. *Nature*. Web.
26. Speakman, John R., and Colin Selman. "The Free-Radical Damage Theory: Accumulating Evidence against a Simple Link of Oxidative Stress to Ageing and Lifespan." *BioEssays* Apr. 2011: 255–259. *BioEssays*. Web.
27. Martins, Rute, Gordon J. Lithgow, and Wolfgang Link. "Long Live FOXO: Unraveling the Role of FOXO Proteins in Aging and Longevity." *Aging Cell* 1 Apr. 2016: 196–207. *Aging Cell*. Web.
28. He, Ying, and Heinrich Jasper. "Studying Aging in Drosophila." *Methods* 68.1 (2014): 129–133. *Methods*. Web.
29. Rogina, Blanka. "For the special issue: Aging studies in Drosophila melanogaster". *Experimental Gerontology* (2011) 46(5) 317-319. Web.
30. Brand, Andrea H, and Perrimon. "Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes." *Development (Cambridge, England)* 118.2 (1993): 401–15. *Development (Cambridge, England)*. Web.
31. Livak, K J, and T D Schmittgen. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25.4 (2001): 402–8. *Methods (San Diego, Calif.)*. Web.
32. Wai, Timothy, and Thomas Langer. "Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27.2 (2016): 105–117. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Web.
33. Sugden, Mary C., and Mark J. Holness. "Mechanisms Underlying Regulation of the Expression and Activities of the Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Kinases." *Archives of Physiology and Biochemistry* 1 June 2006: 139–149. *Archives of Physiology and Biochemistry*. Web.
34. Gkogkolou, Paraskevi, and Markus Böhm. "Advanced Glycation End Products." *Dermato-Endocrinology* 4.3 (2012): 259–270. *Dermato-Endocrinology*. Web.
35. Webb, Ashley E., Anshul Kundaje, and Anne Brunet. "Characterization of the Direct Targets of FOXO Transcription Factors throughout Evolution." *Aging Cell* 15.4 (2016): 673–685. *Aging Cell*. Web.



RAPPORT DE STAGE

*Les individus âgés de *Drosophila melanogaster* avec une fusion mitochondriale altérée dans le muscle présentent des altérations systémiques dans la voie de signalisation Insuline/IGF-1.*

Résumé

Le déséquilibre de la dynamique mitochondriale est un des marqueurs de vieillissement proposés. Bien qu'un stress sévère puisse être préjudiciable, une perturbation mitochondriale légère peut avoir des effets bénéfiques chez différents organismes en prolongeant la durée de vie par une réponse nucléaire complexe (mitohormèse). Des études récentes chez *D. melanogaster* montrent que les organismes avec une fonction altérée de *Marf* et *Opa1* dans les muscles maintiennent la capacité musculaire pendant plus longtemps et présentent une majeure durée de vie ainsi qu'une inflexibilité métabolique. Comme plusieurs évidences pointent vers une implication de la voie de signalisation Insuline/IGF-1 (IIS) dans le contrôle du vieillissement, le but principal de cette étude est de montrer si l'altération de la fusion mitochondriale dans les muscles peut conduire à un mécanisme de compensation systémique de ce stress, en mesurant les niveaux d'expression de certains composants de la voie IIS. Nos résultats suggèrent que la réduction de la force de la voie IIS pourrait prévenir le déclin dépendant de l'âge et renforcent l'importance de l'homéostasie musculaire et la communication tissulaire dans le vieillissement.

Mots clés: *insuline, Drosophila melanogaster, vieillissement, fusion mitochondriale, dynamique mitochondriale.*

Abstract

Mitochondrial dynamics imbalance is one of the proposed hallmarks in aging. Whereas severe stress appears to be detrimental, mild mitochondrial disturbance may have beneficial effects in different organisms by extending lifespan through a complex nuclear response (mitohormesis). Recent studies have reported that *Drosophila* flies with compromised *Marf* and *Opa1* function in muscular tissue show longer muscular capacity and lifespan, along with a metabolic inflexibility. Since several pieces of evidence point toward an implication of the insulin signaling (IIS) pathway in aging control, the main goal of this study is to investigate whether altering mitochondrial fusion in muscles can lead to a systemic compensatory mechanism by measuring the expression levels of some of the components of the IIS. Our results suggest that reducing the IIS strength could prevent age-dependent decline and reinforce the importance of muscle homeostasis and tissue communication in aging.

Keywords: *insulin, Drosophila melanogaster, aging, mitochondrial fusion, mitochondrial dynamics.*