

Université catholique de Louvain

École de biologie



Université de Namur



Département de biologie

Etude de l'agressivité et de l'expression/méthylation de gènes du TLR pathway lors du vieillissement du killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*).

Boulez Aurélien

Mémoire réalisé en vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biologie des Organismes et Écologie

Promoteur

Encadrant

Frédéric Silvestre

Antoine Wittorski

Travail réalisé à l'Université de Namur au sein du Laboratoire de

Physiologie Adaptative et Evolution (LEAP)

2020-2021

Remerciements

Je tiens à remercier Antoine Wittorski pour son encadrement, ses conseils ainsi que pour le temps et l'énergie qu'il m'a consacré. Je remercie également Frédéric Silvestre pour ses 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 et qPCR, Valentine Chapelle et Ivan Blanco pour les conseils sur Ethovision, Anthony Mathiron pour ses conseils en matière de statistique et tous les autres membres de l'équipe de Frédéric Silvestre pour leurs conseils et leur amitié. Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et ma famille qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ce mémoire.

Résumé

Le vieillissement est un phénomène omniprésent dans le règne du vivant. Ce processus est encore à l'heure actuelle énigmatique et pas assez connu. Une branche de la biologie particulièrement intéressante pour étudier ce processus est l'épigénétique, l'étude de l'ensemble des variations héritables d'expressions et d'activités des gènes qui ne font pas intervenir de changements dans le code génétique. Afin de réaliser une étude épigénétique du vieillissement sur une courte période, un modèle biologique idéal se trouve être 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 d'étudier l'expression/méthylation de gènes du TLR pathway et l'agressivité lors du vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*.

Premièrement, un référentiel comportemental reprend les résultats du test d'agressivité MIA réalisée sur quatorze individus à cinq stades de leur vie ainsi que les mesures morphologiques associées à ces poissons en fin d'expérience. L'analyse de l'agressivité de ces poissons a permis de souligner une variabilité inter-individuelle élevée dans la réponse au test réalisé. Une variabilité pour le nombre de morsures et la distance parcourue relative a également été établie entre les différents stades de vie étudiés. Cette variabilité pour le nombre de morsures est traduite par une augmentation du nombre de morsures en semaine 13 et 17 puis une diminution de celui-ci à l'âge le plus avancé. Pour la distance parcourue relative, une augmentation graduelle a été relevée jusqu'en semaine 13 puis une diminution. L'analyse de la mortalité des individus a permis de confirmer une augmentation notoire de l'espérance de vie de la souche GZR en laboratoire. Finalement, un référentiel de méthylation et d'expression relative de séquences géniques a été établi chez les poissons âgés de vingt-et-une semaines. Cinq séquences géniques différentes du TLR pathway ont pu être caractérisées et peuvent être étudiées à l'avenir sur des stades de vie moins avancés de cette espèce. Des effets de la partie promotrice de Tollip, TLR2 ainsi que TLR7 ont été captés sur le nombre de morsures en semaine 21. C'est pourquoi une future recherche sur l'effet des TLR sur le comportement agressif des *Nothobranchius furzeri* âgés est une piste prometteuse pour élucider le vieillissement du système immunitaire, l'inflamm-aging et leurs influences sur l'agressivité.

Abstract

Ageing is an omnipresent phenomenon in the kingdom of life. This process is still enigmatic and too little known. One branch of biology that is particularly interesting for studying this process is epigenetics, the study of all heritable variations in gene expression and activity that do not involve variations in the genetic code. To carry out an epigenetic study of ageing over a short period of time, an ideal biological model is the African fish species: *Nothobranchius furzeri*, the turquoise killifish. This fish is the vertebrate species with the shortest life cycle known to date and goes through all the biological stages characteristic of vertebrates within 3 to 6 months.

The aim of this thesis is to characterise the expression/methylation of TLR pathway genes and aggressiveness associated with ageing in *Nothobranchius furzeri*.

Firstly, a phenotypic baseline includes the results of the MIA aggression test carried out on twenty individuals at five life stages as well as the morphological measurements associated with these fish at the end of the experiment. The aggressiveness reference frame highlighted the high inter-individual variability in the response to the test performed. Variability for number of bites and relative distance travelled was also found between the different life stages studied. This variability in the number of bites is reflected in an increase in the number of bites in weeks 13 and 17 and then a decrease in the number of bites at the oldest age. For the relative distance travelled, a gradual increase was noted until week 13 and then a decrease. Analysis of individual mortality confirmed a significant increase in life expectancy up to 21 weeks for the GZR strain in the laboratory. Finally, a methylation and relative gene sequence expression baseline was established in twenty-one weeks old fish. Five different gene sequences of the TLR pathway could be characterised and can be studied in the future in less advanced life stages of this species. Effects of the promoter part of Tollip, TLR2 as well as TLR7 were detected on the number of bites in week 21. Therefore, future research on the effect of TLRs on the aggressive behaviour of aged *Nothobranchius furzeri* is a promising avenue to elucidate immune system ageing, inflamm-aging and their influences on aggression.

Table des matières

Introduction	9
1) Le vieillissement	12
1.2) Théories du vieillissement	13
2.3) Marqueurs du vieillissement	15
2) Le comportement	18
2.1) Comportement animal.....	18
2.2) Différences comportementales individuelles : Les traits de personnalité	19
2.3) Syndrome comportemental.....	21
2.3) Agressivité.....	23
2.3.1) Molécules sous-jacentes à l'agressivité.....	25
2.3.2) Liens potentiels entre agressivité et vieillissement.....	27
3) Epigénétique.....	27
3.1) Origine.....	27
3.2) Mécanismes épigénétiques	28
3.2.1) Méthylation de l'ADN	30
3.3) Lien entre épigénétique et vieillissement	34
4) Voie métabolique des Toll like receptor (TLR)	36
4.1) Gènes d'intérêts.....	38
5) Nothobranchius furzeri	39

5.1) Habitat et mode de vie	40
5.2) Cycle de vie	41
5.3) Intérêts du <i>Nothobranchius furzeri</i>	42
6) Objectif du mémoire	44
6.1) Objectifs spécifiques	44
6.1.1) Agressivité en fonction de l'âge.....	44
6.1.2) Méthylation des gènes du TLR pathway en fonction de l'âge.....	44
6.1.3) Expression relative des gènes du TLR pathway en fonction de l'âge	44
Matériel et méthode.....	45
1) Elevage et maintien de la lignée de killifish	45
1.1) Système d'élevage	45
2) Design expérimental.....	46
3) Mesures de l'agressivité et mesures morphologiques chez <i>Nothobranchius furzeri</i>	46
3.1) Analyse comportementale.....	46
3.2) Mesures morphologiques.....	48
4) Caractérisation épigénétique du TLR pathway et expression relative des gènes d'intérêts de <i>Nothobranchius furzeri</i>	50
4.1) Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêts.....	50
4.2) Extraction d'ADN et d'ARN	51
4.3) Pyroséquençage.....	51

4.4) qPCR et expression relative des gènes d'intérêt	52
5) Statistiques	55
5.1) ACP sur les variables réponses et explicatives pour les deux analyses.....	56
5.2) Première analyse : agressivité en fonction de l'âge	56
5.2.1) Conception des modèles	57
6.1) Analyse de l'agressivité en S21	58
Résultats	60
1) Agressivité en fonction de l'âge	60
1.1) Morsures en fonction de l'âge.....	60
1.2) Latence avant la première morsure en fonction de l'âge	61
1.3) Temps passé dans la zone éloignée en fonction de l'âge.....	63
1.4) Distance parcourue en fonction de l'âge.....	64
2) Agressivité en S21	66
2.1) Morsures chez les poissons âgés de 21 semaines	66
2.2) Temps passé dans la zone intermédiaire chez les poissons âgés de 21 semaines....	66
2.3) Temps passé dans la zone éloignée et la distance parcourue relative chez les poissons âgés de 21 semaines	67
3) Pourcentage de méthylation en fonction des gènes d'intérêts.....	67
5.1) TLR2.....	67
5.2) TLR5.....	67

5.3) TLR7.....	68
5.4) TLR9.....	68
5.5) TOLLIP	68
Discussion.....	70
1) Taux de survie du <i>Nothobranchius furzeri</i>	70
2) Test d'agressivité MIA	72
3) Analyse de l'agressivité avec l'âge	72
4) Distance parcourue relative avec l'âge	75
5) Agressivité et variabilité inter-individuelle	76
6) Analyse de l'agressivité en S21	78
7) Caractérisation épigénétique	79
6.1) TLR2.....	80
6.2) TLR5.....	80
6.3) TLR7-TLR9.....	81
6.4) TOLLIP (toll interacting-protein)	81
Conclusion	83
Perspectives	84
Bibliographie :	85
Annexe	114
Choix des variables explicatives pour l'analyse 1	117

Choix des variables réponses pour l'analyse 1	118
Choix des variables explicatives pour l'analyse 2	120
Choix des variables réponses pour l'analyse 2	123

Introduction

Du microscopique au macroscopique, depuis toujours les naturalistes s'interrogent sur l'origine et la diversité du vivant : d'où proviennent tous ces organismes ? Sont-ils là depuis toujours ? Comment les espèces évoluent et interagissent-elles ? Des philosophes grecs comme Platon ou Aristote cogitaient déjà à ce sujet et sont à la base d'un courant philosophique suggérant que les espèces diffèrent entre elles par essence, qu'il existe dans la nature une classification « non humaine » : l'essentialisme (Douglas, 2013). Fortement critiqué, ce courant de pensées a été abandonné pour une théorie dont l'ampleur et le succès est si grand qu'elle n'a toujours pas été réfutée : **la théorie de l'évolution**.

Le précurseur de la théorie d'évolution est Jean Baptiste de Lamarck qui émit l'idée du transformisme dans son livre « *Recherche sur l'organisation des corps vivants* » de 1802. Selon lui, les organismes subissent des modifications dues au milieu et à leurs modes de vies et celles-ci sont transmises de générations en générations. Les oiseaux seraient alors apparus à partir des reptiles à la suite de l'accumulation de nombreuses modifications transmises au fil des générations. Ces idées furent considérées comme les bases de la théorie de l'évolution (Corsi, 2001).

La théorie de l'évolution graduelle des organismes, en tant que tel, a été étayée plus tard dans les ouvrages publiés par Alfred Russel Wallace et Charles Darwin. Cette théorie sous-entend que les organismes vivants existant sur terre auraient évolués à partir d'un ancêtre commun. L'ancêtre commun correspondrait à l'espèce initiale à partir de laquelle des transformations progressives et différentielles auraient donné différentes espèces. Par ce même processus, ces espèces auraient donné les espèces connues actuellement (Kutschera et Niklas, 2004). Le livre de Darwin, publié en 1859, « *The origin of species* » eût l'effet d'une bombe en apportant, contrairement à Wallace, un vaste ensemble de faits tirés principalement d'expériences de reproduction et de fossiles pour supporter la théorie de l'évolution (Kutschera et Niklas, 2004). Cette théorie possède deux composantes essentielles. La première est l'apparition spontanée de variations inter-individuelles qui se transmettent à la descendance. L'apparition de ces variations est dite spontanée car, à l'époque, Darwin ne connaissait pas la notion de mutation. La seconde composante se concentre sur les variations. Certaines sont favorisées dans la

descendance au point de donner des espèces nouvelles, alors que d'autres variations sont éliminées. C'est possible grâce à la **sélection naturelle** (Darwin, 1859). Dans son livre, Darwin explique le concept de sélection naturelle par : « Il naît beaucoup plus d'individus de chaque espèce qu'il n'en peut survivre. En conséquence, la lutte pour l'existence se renouvelle à chaque instant. Il s'en suit que tout être qui varie quelque peu et que ce soit d'une façon qui lui est profitable, a une plus grande chance de survivre. Cet être est l'objet d'une sélection naturelle. En vertu du principe si puissant de l'hérédité, toute variété, objet de la sélection, tendra à propager sa nouvelle forme modifiée ». Cette théorie fût adoptée par de nombreux scientifiques de l'époque de telle sorte que cette façon de voir les choses ait été nommée « Darwinisme ». Le Darwinisme se basait principalement sur des observations morphologiques d'espèces vivantes et de fossiles (Kutschera et Niklas, 2004).

Au cours du siècle dernier, l'intégration de la pensée de Darwin avec les progrès des sciences génétiques et moléculaires a facilité le développement d'une théorie de l'évolution dite néo-darwinienne (Olson-Manning *et al.*, 2012). Dans cette théorie néo-darwinienne, les mutations génétiques favorisent la variation phénotypique sur laquelle agit la sélection naturelle (Skinner, 2015). En parallèle de cette théorie, Le Néo-lamarckisme s'est développé. Cette théorie met l'accent sur le rôle important de l'environnement dans la variation phénotypique qui serait causée par des altérations non génétiques dues à l'environnement, appelées épigénétiques. En 2015, une équipe de recherche a proposé une théorie unificatrice car l'épigénétique et les mutations génétiques favorisent toutes deux la variation phénotypique sur laquelle agit la sélection naturelle (**Figure 1**) (Skinner, 2015).

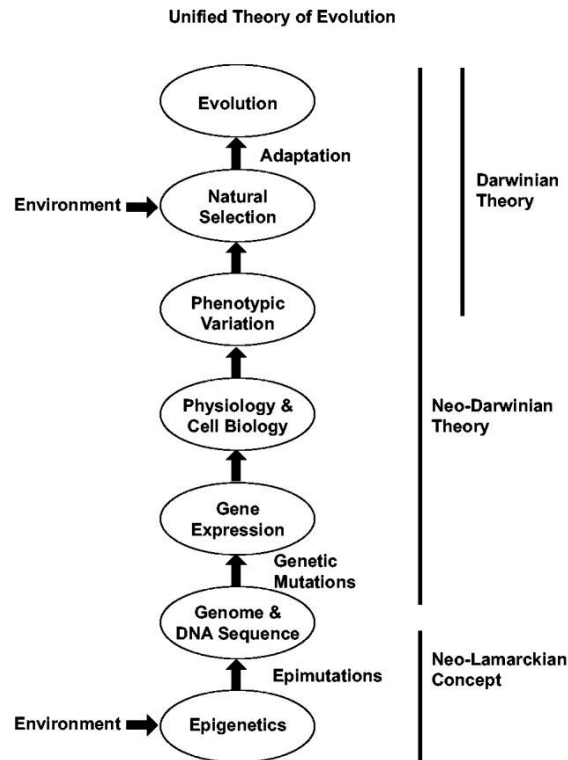


Figure 1 : La théorie unifiée du néodarwinisme et du néolamarckisme (Skinner, 2015).

Cette théorie a permis de faire de l'évolution un concept clé dans les études en biologie permettant d'expliquer de nombreux phénomènes et processus du monde vivant. Que ce soit au niveau génétique et moléculaire avec l'évolution par duplication des gènes (Kellis *et al.*, 2004), au niveau cellulaire avec la théorie de l'endosymbiose (Martin *et al.*, 2015 ; Zimorski *et al.*, 2014), au niveau de l'individu via l'adaptation d'un organisme à son milieu, lors de l'étude de la dynamique des populations (Allen *et al.*, 2017) ou encore lors de l'étude de l'influence de l'environnement sur l'évolution elle-même (Skinner, 2015).

L'évolution est donc devenue un outil qui permet de mieux comprendre de nombreux aspects biologiques. En effet, cette théorie peut être utilisée autant pour décrire l'apparition de processus biologiques comme la symbiose (Norris, 1996) que pour faire avancer nos connaissances sur des scénarios évolutifs en l'incluant dans un modèle informatique (Batut *et al.*, 2013). Cependant, de nombreuses questions restent en suspens, notamment celles concernant la reproduction. Celle-ci permet de perpétuer l'espèce en transmettant les gènes à la descendance, ce qui en fait un moteur évolutif. Toutefois, certaines stratégies reproductrices comme l'haplo-diploïdie ne sont pas fort bien comprises. Cette stratégie, présente chez les insectes sociaux, détermine le sexe sur base des œufs pondus. Ainsi, les œufs fécondés donneront des femelles et les non-fécondés donneront des mâles (Aamidor *et*

al., 2018). La compréhension du pourquoi et du comment l'haplo-diploïdie a été sélectionnée reste un mystère et nécessite de futures investigations. La maximisation des chances de reproductions reste tout de même la règle générale.

La reproduction, malgré son importance, n'est généralement pas synonyme de fin de vie pour un individu. Un mécanisme inhérent à toutes les espèces vivantes, qu'elles aient le temps de se reproduire ou non, existe et a une place primordiale dans le cycle de la vie. Ce mécanisme est le vieillissement. Comme la plupart des mécanismes biologiques, celui-ci est également soumis à l'évolution. Un individu, après avoir réalisé une ou plusieurs reproductions, pourrait mourir pour laisser place à sa descendance. Or ce n'est pas ce qu'il se passe réellement, l'individu vieillira à la place. Mais pourquoi le vieillissement a été sélectionné sachant que ce processus nous fragilise ? A-t-il une utilité ? Ce mécanisme chez l'homme s'est avéré être un processus complexe de déclin fonctionnel et d'accumulation de diverses pathologies dans différents tissus (López-Otín *et al.*, 2013). Quels mécanismes sont sous-jacents à celui-ci ? Pour essayer de répondre à ces questions, il faut d'abord décrire ce phénomène.

1) Le vieillissement

Le vieillissement est communément défini comme une détérioration progressive d'un individu au fil du temps, dans laquelle une augmentation du risque de mortalité et une baisse de fertilité est observée avec l'âge (Kirkwood *et al.*, 1982 ; Rose, 1991 ; Austad, 1997 ; Kirkwood, 1999). Les êtres vivants, allant des bactéries (Ackermann *et al.*, 2003) jusqu'aux mammifères subissent le vieillissement. Cependant, des exceptions existent comme la bactérie *Tetrahymena* ainsi que l'hydre qui ne montrent aucun signe de vieillissement tel que déterminé par une augmentation du risque de mortalité avec l'âge (West *et al.*, 2019). Le vieillissement est un processus inévitable néanmoins il ne peut pas être expliqué par le résultat de l'usure biologique notamment par l'existence d'exceptions comme *Tetrahymena* (Kirkwood *et al.*, 2000 ; West *et al.*, 2019). Cela a intrigué et intrigue toujours de nombreux chercheurs. C'est pourquoi de nombreuses théories ont été émises pour tenter d'expliquer son origine.

1.2) Théories du vieillissement

La première théorie du vieillissement, émise par August Weismann au XIXe siècle, propose que le vieillissement soit programmé afin de limiter la taille de la population ou d'accélérer le renouvellement des générations, facilitant ainsi l'adaptation d'une espèce aux environnements changeants. Le vieillissement est interprété alors comme un processus à part entière impliqué dans la sélection naturelle et contribuant nettement à la mortalité d'une espèce (Weismann, 1891 ; Kirkwood et Cremer, 1982). Or la mortalité naturelle n'est en général pas causée par le vieillissement. En effet, la mortalité naturelle est principalement dû à des facteurs extrinsèques comme les maladies, la prédation, la famine ou encore le froid. Malgré le fait que le vieillissement rend également les espèces plus sensibles à ces stress, les animaux sauvages ne survivent en général pas assez longtemps que pour vieillir (**Fig 2a**) (Kirkwood et Austad, 2000 ; Bowles, 1998). En raison de cette mortalité extrinsèque, la force de la sélection naturelle s'affaiblit progressivement avec l'âge (Charlesworth, 1994). Toutefois, il est intéressant de noter qu'avec le vieillissement, une sensibilité plus accrue s'observe vis-à-vis des maladies, des famines ou du froid. Plus tard, Medawar réfuta la proposition de Weismann d'une possibilité de sélection sur le vieillissement. Selon lui, la sélection ne se réaliserait pas sur des gènes influençant un caractère tardif étant donné qu'elle se concrétiserait à la reproduction (Medawar, 1952).

De cette idée est née la théorie de la pléiotropie antagoniste proposé par Williams en 1957. La pléiotropie se réfère à des gènes qui déterminent plusieurs caractères phénotypiques. Les gènes pléiotropes ayant de bons effets précoces et pouvant mener à une fécondité accrue seraient sélectionnés même s'ils peuvent avoir des effets néfastes à un âge plus tardif (**Fig2b**) (Kirkwood et Austad, 2000 ; Tuminello et Han, 2011). Par conséquent, une fois que la reproduction a eu lieu, peu de pression sélective s'exerce pour éliminer ces gènes pléiotropes même s'ils présentent des effets délétères sur la forme physique ou la viabilité. La pléiotropie est donc antagoniste car pendant la vie d'un individu jusqu'à sa reproduction, la pression sélective est forte sur ces gènes alors qu'après que l'individu s'est reproduit, elle s'affaiblit (Tuminello et Han, 2011 ; Williams 1957 ; Kirkwood et Austad, 2000 ; West *et al.*, 2019). Un petit effet bénéfique au début de la vie peut donc l'emporter sur un effet délétère tardif même s'il entraîne le vieillissement et la mort. Cela introduit l'idée importante d'un compromis par

rapport au cycle de vie qui est au centre de la théorie du « soma jetable » (Kirkwood, 1977, Kirkwood, 1996).

La théorie du « soma jetable » stipule que le vieillissement est le résultat d'un compromis d'allocation de ressources métaboliques entre la reproduction et le maintien des cellules somatiques (Kirkwood, 1977; Kirkwood, 1996 ; Lemaître *et al.*, 2015 ; Valdesalici et Cellerino, 2003). Selon cette théorie, un plus grand investissement dans la maintenance somatique est inutile et évolutivement pas stable car l'organisme sera toujours sujet à la limitation des ressources environnementales et à la mortalité due aux facteurs environnementaux. En ce sens, le soma est jetable et l'investissement dans la maintenance somatique doit être optimisé pour qu'il puisse y avoir un investissement dans la reproduction (**Fig 2c**) (Kirkwood, 1977). De ce fait, un investissement plus important dans la reproduction raccourcirait la durée de vie en réduisant les investissements dans la maintenance. A l'inverse, une réduction de l'investissement dans la reproduction permettrait une redistribution des ressources vers la protection des mécanismes de maintenances, prolongeant ainsi la durée de vie (Gladyshev, 2013). Les deux dernières théories qui ont été abordées peuvent se confondre. Cependant, le « soma jetable » se concentre sur le rôle de la maintenance et de la reproduction en terme énergétique tandis que la pléiotropie antagoniste reste plus générale en parlant de gènes pléiotropes(Kirkwood et Austad, 2000).

Ces deux théories ont été soutenues par de nombreux tests sur des drosophiles (*Drosophila melanogaster*), réalisés notamment sur la sélection. Il a été prouvé qu'en restreignant la reproduction aux individus âgés, une augmentation de l'intensité de la sélection était observée sur les dernières parties de la durée de vie de ces individus, prolongeant la longévité des individus testées. (Rose et Charlesworth, 1980 ; Luckinbill *et al.*, 1984 ; Partridge *et al.*, 1999 ; Buck *et al.*, 2000). De plus, des corrélations entre longue durée de vie et fécondité réduite ont été également observées, soutenant encore plus ces théories (Kirkwood et Austad, 2000). Ces théories sont liées entre-elles et peuvent expliquer les raisons évolutives du vieillissement, cependant, que savons nous des bases moléculaires et génétiques du vieillissement ? Il existe à la base des théories évolutives qui ont été développées ci-dessus, une modulation et une structuration des gènes (Heid, 2018). En conséquence de cela, de multiples marqueurs génétiques et moléculaires ont été associés au vieillissement.

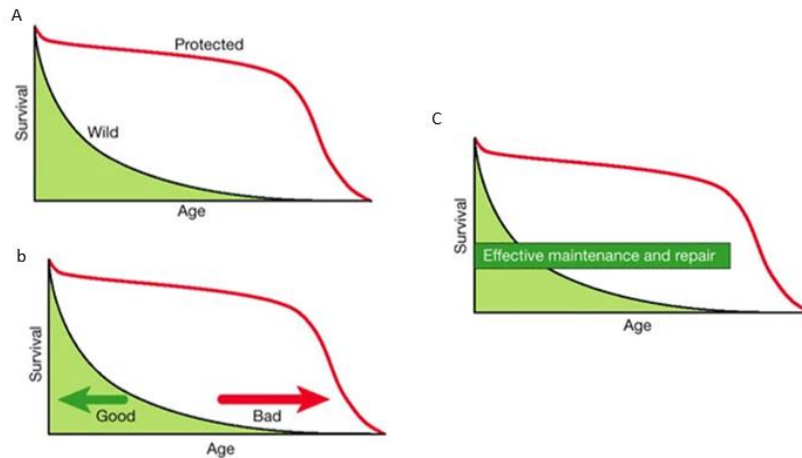


Figure 1 : Différentes théories du vieillissement : A) Déficit de la théorie de Weismann, montrant que la mortalité associée avec l'âge est rare en milieu naturel dû à la mortalité extrinsèque. B) Pléiotropie antagoniste : les gènes pléiotropes avec un effet positif tôt dans la vie sont sélectionnés même si l'effet est négatif plus tard. C) Théorie du soma jetable. L'allocation énergétique alloué au maintien de la maintenance est optimisée de sorte à avoir une allocation énergétique pour la reproduction. Adaptée de Kirkwood et al., 2000

2.3) Marqueurs du vieillissement

La recherche sur le vieillissement a connu une avancée sans précédent ces dernières années, notamment avec la découverte que le taux de vieillissement est contrôlé par des voies génétiques et des processus biochimiques conservés dans l'évolution (López-Otín *et al.*, 2013). À la suite de cette avancée, de multiples théories furent émises sur les marqueurs génétiques et moléculaires liés au vieillissement. Une des premières est celle sur les radicaux libres.

L'idée que la respiration cellulaire permette de vivre plus ou moins longtemps a été émise par Rubner en 1908. Plus tard, en 1956, Harman démontra que le vieillissement n'est en réalité pas le résultat de la respiration mais plutôt dû aux produits secondaires de la réaction de transformation de l'oxygène en énergie : « reactive oxygen species » (ROS) (Harman, 1956). La formation des ROS est associée à un dysfonctionnement de la chaîne de transporteurs d'électrons dans la mitochondrie ou aux NADPH oxydases (NOX) (Camougrand et Rigoulet, 2001 ; Glasauer et Chandel, 2012). Ceux-ci s'accumulent et engendrent alors des dommages par de multiples voies aux biomolécules, menant ainsi à la senescence cellulaire (Harman, 1992 ; Cadenas et Davies, 2000).

De nombreuses autres théories ont été émises par la suite. Elles ont, il y a peu, été réunies et classées en 9 grands processus biologiques associés au vieillissement (**Figure 3**) : une instabilité génomique, une usure des télomères, des altérations de la communication intercellulaire, une perte de la protéostase, une dérégulation de la détection de nutriments, des dysfonctions mitochondriales, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et enfin, l'altération épigénétiques (López-Otín *et al.*, 2013). Ces processus forment ensemble les marqueurs du vieillissement. L'investigation plus précise de ces marqueurs a permis la découverte des biomarqueurs moléculaires du vieillissement.



Figure 3 : Ce schéma énumère les neuf processus associés au vieillissement : 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).

Les biomarqueurs moléculaires du vieillissement sont très utiles dans la recherche notamment dans le domaine de la médecine. Ils doivent pouvoir prédire le taux de vieillissement et contrôler un processus de base qui sous-tend le processus de vieillissement selon The American Federation for Aging Research (AFAR) (Xia *et al.*, 2017). Il en existe énormément et il est impossible de tous les développer dans le cadre de ce mémoire, cependant la plupart

d'entre eux, chez les humains (1 cas pour la souris), sont repris dans le **tableau 1** (Xia *et al.*, 2017).

Tableau 1 : Biomarqueurs du vieillissement. Adapté de (Xia *et al.*, 2017).

Catégorie du biomarqueur	Sous-catégorie du biomarqueur	Biomarqueur	Tendance ave l'âge	Espèce
ADN et chromosomes	Télomère	Longueur du télomère chez les leucocytes	Diminue	Humain
	Réparation de l'ADN	Immunohistochimie H2A.X	Augmente	Humain
	Modification épigénétique	Méthylation de l'ADN	Hypométhylation globale et hyperméthylation locale	Humain
ARN et transcriptome	Profils transcriptomique	Hétérogénéité des CD38 dans les CD4+CD27+ Les cellules T	Diminue	Humain
		Hétérogénéité de CD197 dans CD4+CD25 Les cellules T	Augmente	Humain
	Micro-ARNs	miR-34a, miR-21, miR-126-3p	Augmente	Humain
		miR-151a-3p, miR-181a-5p, miR-1248	Diminue	Humain
	Longs ARN non-codants	MIR31HG	Augmente dans la senescence cellulaire	Humain
		AK156230	Diminue dans la senescence cellulaire	Souris
Meg3		Augmente dans la senescence cellulaire	Humain	
Métabolisme	Détection des nutriments	Hormone de croissance et insuline/insuline facteur de croissance 1 (IGF-1)	Diminue	Humain
		Cible mécaniste de la rapamycine (mTOR) et pS6RP	Augmente	Humain
		NAD+, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT6	Diminue	Humain
	Métabolisme des protéines	La carbamylation des protéines, telle que taux d'homocitrulline	Augmente	Humain
		Produits finis de glycation avancée et les N-glycanes	Augmente	Humain
	Métabolisme des lipides	Triglycerides	Augmente	Humain
Stress oxydatif et mitochondrie		o-tyrosine, 3-chlorotyrosine, 3-nitrotyrosine, 8-iso prostaglandin F2 α , 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine	Augmente	Humain
Senescence cellulaire		Senescence-associée β -galactosidase	Augmente dans la senescence cellulaire	Humain
		p16INK4A	Augmente dans la senescence	Humain
Inflammation et communication cellulaire		Sécrétariat associé à la sénescence phénotype	Augmente	Humain

Chez les animaux, les marqueurs comme la longueur des télomères, la méthylation de l'ADN ainsi que les ROS sont les plus souvent utilisées (Jarman *et al.*, 2015). Il existe également deux biomarqueurs d'âge biochimique : la lipofuscine et la racémisation des acides aminés (AA). La lipofuscine est un mélange pigmenté de composés formés en grande partie par la dégradation oxydative des acides gras insaturés, mais incorporant également des sucres et des ions métalliques. Celle-ci s'accumule avec l'âge et est le plus souvent testé dans le tissu nerveux (Jarman *et al.*, 2015). Elle a été utilisée notamment pour estimer l'âge d'un large éventail d'animaux, y compris les crustacés (Uglem *et al.*, 2005), bivalves (Ridgway et Richardson, 2011) et les nématodes (Pincus *et al.*, 2011). La racémisation des AA (RAA) est le changement progressif des acides aminés qui sont synthétisés dans la polarité en « L » vers la polarité miroir

« D ». Il est possible d'estimer l'âge en utilisant le développement progressif d'un rapport D : L plus élevé grâce à RAA (Jarman *et al.*, 2015). Un exemple où la RAA a été utilisée est l'estimation de l'âge chez des baleines boréales mortes (Rosa *et al.*, 2013).

Malgré toutes ces connaissances sur le vieillissement, il n'y a pas encore eu de théorie unificatrice sur sa cause ultime. Compte tenu de tous les paramètres qui affectent le vieillissement au niveau physiologique, celui-ci peut être défini comme un processus universel et multifactoriel caractérisé par un déclin progressif des fonctions physiologiques, se produisant aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire (Campisi J, 2013). Au-delà des marqueurs moléculaires qui existent par rapport au vieillissement, il existe de nombreuses voies métaboliques contrôlant les gènes et molécules qui y sont liées. Notamment la voie des TLR qui sera, plus tard, spécifiquement développée dans le cadre de ce mémoire.

Etant donné que le vieillissement affecte toutes les échelles biologiques, il affecte entre-autre le cerveau. C'est dans celui-ci que réside les voies et molécules sous-jacentes au comportement. Le vieillissement peut donc affecter ces voies et ultimement affecter le comportement mais existe-t-il un lien entre le comportement et le vieillissement ? Un certain type de comportement pourrait-il amener à un changement physiologique tel qu'il engendrerait un déclin de fonctions physiologiques ? Pour cela, il faut s'attarder un peu plus sur le comportement et ses origines.

2) Le comportement

2.1) Comportement animal

Le comportement animal a toujours intéressé l'homme, cela a commencé il y a 30 000 ans avec des peintures rupestres montrant des scènes de chasse. L'intérêt était de représenter et comprendre les habitudes des proies dans leur environnement dans le but d'améliorer les méthodes de chasse. Le premier à avoir décrit le comportement animal avec un point de vue évolutif est Charles Darwin dans son livre "On the origin of species" (1859). Il s'est intéressé à comprendre comment la sélection naturelle aurait pu former des comportements sophistiqués à partir de comportements basiques. Notamment grâce à son investigation sur le comportement du coucou déposant ses œufs dans le nid d'un autre oiseau. Comment ce comportement a-t-il été sélectionné à partir du comportement basique d'un oiseau réalisant son propre nid. Cette question est encore d'actualité (Wyatt, 2017).

Un des grands défis qui existe en biologie est la compréhension des interactions entre les organismes et leur environnement. Le comportement est l'un des principaux mécanismes utilisés par les animaux pour s'acclimater et s'adapter à leur environnement. Celui-ci affecte et est affecté par le développement, la physiologie, le choix environnemental, la dynamique écologique et l'évolution (Sih *et al.*, 2010).

Le comportement animal a été défini par Levitis *et al.*, (2009) comme "les réponses coordonnées en interne (actions ou inactions) d'organismes vivants (individus ou groupes) à des stimuli internes et/ou externes, à l'exclusion des changements développementaux". Dès lors, un suricate qui monte la garde au-dessus de son terrier, une pieuvre qui change de couleur sur un récif corallien ou encore un insecte récoltant le nectar d'une fleur, tous sont des exemples de comportement animal.

L'étude du comportement animal (éthologie) a été instauré par Darwin en 1859. L'éthologie s'est fortement élargie par la suite quand les différences comportementales individuelles furent la cible dans la recherche (Conrad *et al.*, 2011 ; Reale *et al.*, 2010 ; Sih *et al.*, 2004 ; Wolf et Weissing, 2012).

Cette variation comportementale individuelle des animaux a connu un succès auprès des chercheurs par son importance au niveau écologique et évolutif. En effet, c'est une matière première sur laquelle la sélection naturelle agit au niveau de l'individu (Roche *et al.*, 2016)

2.2) Différences comportementales individuelles : Les traits de personnalité

Les traits de personnalité peuvent être définis comme "les différences individuelles de comportement qui sont cohérentes dans le temps et à travers les contextes" (Stamp et Groothuis, 2010). Comme illustré à la **figure 4**, 5 principaux traits de personnalité ont été décrits chez les animaux : l'agressivité, l'audace, l'activité, l'exploration et la sociabilité malgré qu'il en existe potentiellement beaucoup d'autres. Les traits de personnalité combinés entre eux, forment la personnalité de l'animal et ont été reportés chez de nombreuses espèces provenant de différents clades (les mollusques, les arthropodes, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, les poissons, et les mammifères) (Conrad *et al.*, 2011 ; Courtene-Jones et Briffa, 2014 ; Gosling, 2001 ; Hulthen *et al.*, 2014 ; Hurtado et Mabry, 2017 ; Niemelä *et al.*, 2012a ; Sih *et al.*, 2004 ; Toms *et al.*, 2010 ; Wolf et Weissing, 2012)

Ces traits de personnalité seraient dû à ce qu'on appelle l'individualité comportementale, se développant à partir de sources génétiques, environnementales ou de l'interaction des deux. De plus, l'interaction sociale serait un facteur important du développement du trait de personnalité. (Bierbach *et al.*, 2017, Freund *et al.*, 2013a).

Les phénotypes comportementaux qui permettent à une espèce de développer de meilleures capacités de survie, de trouver plus facilement un partenaire et d'avoir une descendance sont primordiaux et sous sélection naturelle (Brown *et al.*, 2007). En d'autres termes, les phénotypes comportementaux qui maximisent le fitness (capacité d'un individu à survivre et à se reproduire) sont sous sélection naturelle. Les traits de personnalité sont des phénotypes comportementaux particuliers qui engendrent des conséquences sur le fitness de différentes manières. Par exemple, l'audace peut faciliter l'accès à la nourriture et influencer la survie tandis que l'agressivité peut augmenter les chances de reproduction via la dominance (**Figure 4**). Les traits de personnalité sont donc sous sélection naturelle car ils influencent le fitness (Burns, 2008 ; Reale *et al.*, 2007).

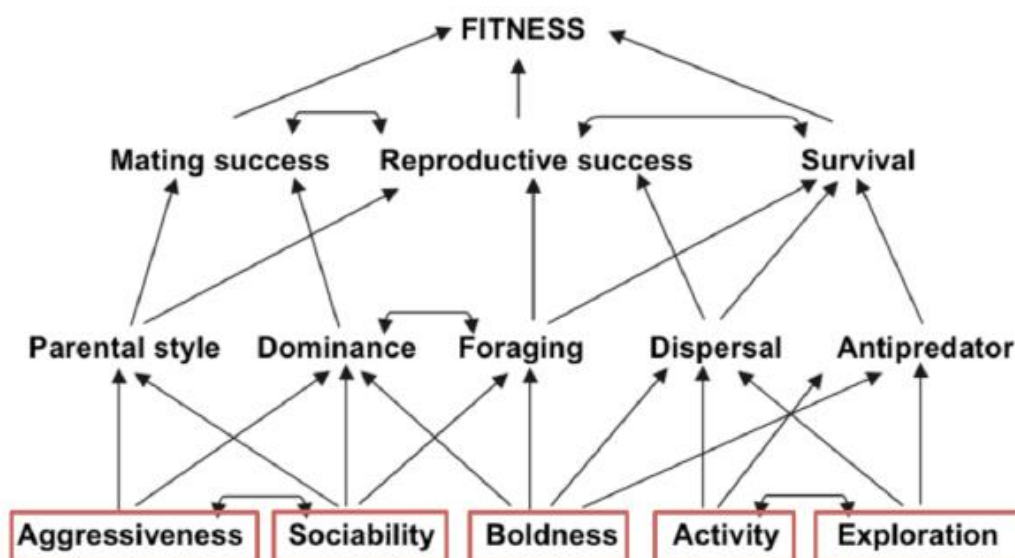


Figure 4 : Diagramme illustrant l'influence des 5 traits de personnalité majoritairement étudiés (en rouge) sur les traits de composantes et les traits composites entraînant des conséquences sur l'aptitude de l'organisme. Adapté de Reale *et al.*, 2007

2.3) Syndrome comportemental

Les biologistes s'intéressant au comportement ont pu remarquer que certains traits de personnalité pouvaient être corrélés entre eux et cela dans différents taxa incluant invertébrés, amphibiens, reptiles, poissons, oiseaux et mammifères (Bell, 2004 ; Gosling, 2001 ; Kelleher *et al.*, 2018 ; Sih *et al.*, 2004 ; Sih et Watters, 2005)

Chez de nombreuses espèces, les individus présentent une cohérence à la fois intra-individuelle et inter-individuelle dans leurs comportements à travers le temps ou les contextes écologiques (Sih *et al.*, 2004 ; Sih et Bell, 2008). C'est ce qu'on appelle un syndrome comportemental. Plus simplement, deux ou plusieurs traits comportementaux peuvent covarier en fonction du temps et du contexte (Conrad *et al.*, 2011 ; Sih *et al.*, 2004). Les syndromes comportementaux sont extrêmement pertinents pour l'écologie et l'évolution car ils impliquent que la plasticité des traits comportementaux peut être limitée, ce qui limite alors la capacité des animaux à se comporter de manière optimale dans toutes les situations (Sih *et al.*, 2004). Un syndrome comportemental pourrait donc tout aussi bien être adaptatif si l'individu se comporte de manière optimale selon un certain contexte écologique ou alors maladaptatif s'il n'en est pas capable (Bell et Stamps, 2004 ; Sih et Bell, 2008).

Il existe une corrélation positive entre l'agressivité et l'audace dans la plupart des cas. Cela signifie que dans une population certains individus plus agressifs seront également plus audacieux. Ils sont alors plus aptes à pouvoir faire face à un prédateur ou encore à se battre avec d'autres individus de la population (Wolf *et al.*, 2007). L'association de ces deux traits de personnalité peut en réalité être liée à un processus adaptatif impliquant les traits d'histoires de vie. En effet, les individus étant plus audacieux et agressifs pourraient connaître une plus grande croissance et un plus grand succès reproducteur. Malgré cela, les individus agressifs et audacieux sont plus facilement exposés à des risques comme la prédation ou le parasitisme, augmentant alors le risque de mortalité. Cette association montre qu'un syndrome comportemental peut être adaptatif ou maladaptatif selon le contexte et à travers temps. La présence d'un compromis entre ces deux traits définit la limite de plasticité de chacun d'eux (Sih *et al.*, 2004). Le compromis qui convient le mieux pour un environnement précis sera donc retenu par le processus de sélection naturelle (Conrad *et al.*, 2011)

L'exemple qui a été choisi est en réalité le syndrome comportemental le plus étudié (Sih *et al.*, 2004). La corrélation positive existante entre agressivité et audace a été retrouvée chez de nombreuses espèces comme chez l'ombre commun (*Thymallus thymallus*) ou l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*). Cependant le syndrome peut disparaître/varier en fonction de la pression des prédateurs (Bell and Stamps, 2004 ; Salonen et Peuhkuri, 2006). La première étude montrant une corrélation est celle d'Huntingford en 1976. Celle-ci a décrite qu'il existait une corrélation positive entre l'agression territoriale de l'épinoche (*G. aculeatus*) et leur audace auprès d'un prédateur. Plus tard, Une étude sur le porte-épée (*Xiphophorus multilineatus*) a révélé qu'une descendance nourrie avec une alimentation riche montrait une corrélation positive entre agressivité et audace alors qu'une descendance nourrie avec une alimentation pauvre n'en montrait pas (D'Amore *et al.*, 2015). Cela montre que, comme mentionné dans la review de Sih *et al.*, (2015), les personnalités et syndromes animales varient en fonction de l'environnement. Cependant, il existe des exceptions comme chez *Kryptolebias marmoratus* qui n'a apparemment pas de syndrome marqué entre audace et agressivité (Carion, 2020).

Bien que les syndromes comportementaux aient été largement étudiés, le mécanisme qui sous-tend leur formation n'est pas bien compris et ne seraient pas seulement dû à une variation environnementale. Les syndromes comportementaux pourraient être causés par une contrainte génétique ou hormonale (Drent *et al.*, 2003 ; Dingemanse *et al.*, 2007) ou par la sélection de comportements en réponse à la pression environnementale (Bell, 2005 ; Bell et Sih, 2007). Pour ce qui est de la partie génétique, il a été prouvé qu'une mutation du gène codant pour le récepteur 1a du facteur de croissance des fibroblastes (*fgfr1a*) peut augmenter l'agressivité et l'audace de zebrafish adultes (Norton *et al.*, 2011). Cette étude montre que la contrainte génétique peut influencer le syndrome comportemental d'agressivité-audace. Cependant, chez l'épinoche, cette corrélation entre agressivité et audace varie en fonction de l'environnement (Bell, 2005 ; Bell et Sih, 2007). Il semble donc probable qu'une combinaison de contraintes génétiques ou hormonales et de conditions environnementales contrôle l'expression des syndromes comportementaux (Bell et Sih, 2007).

2.3) Agressivité

L'agressivité consiste en la propension des organismes à être agressifs envers d'autres individus. L'agressivité aide pour protéger des ressources, un territoire ou se défendre face à un prédateur ou des rivaux (Ellison *et al.*, 2013). Ce trait de personnalité chez les mâles permet également de maintenir une certaine hiérarchie chez les espèces grégaires et donc un meilleur accès à la nourriture et aux femelles (Ang et Manica, 2010). Chez les vertébrés, la poursuite est une interaction agressive qui empêche les autres mâles d'acquérir un territoire ou un partenaire en plus d'instaurer une dominance (Larson *et al.*, 2006). Chez les poissons, cette dominance permet d'influencer le succès reproducteur chez le porte-épée (*Xiphophorus helleri*) (Royle *et al.*, 2005). Pour d'autres espèces, cela peut se réaliser en limitant l'accès à la reproduction (Kodric-Brown, 1992) ou encore parce que des individus dominants sont préférés par les femelles (Cooper et Vitt, 1987). Ce trait peut mener à une forte demande en énergie ou à des risques plus élevés de blessures graves/mort, cependant le bénéfice acquis avec ce trait est souvent supérieur à la perte qu'il pourrait engendrer (Ruiz-Gomez et Huntingford, 2012).

L'équipe d'Ariyomo (2012) a démontré que chez les zebrafish, les mâles les plus agressifs et audacieux possédaient un succès reproducteur plus élevé. L'agressivité y joue un rôle important car les mâles agressifs défendent leur territoire et empêchent les autres mâles de gagner l'accès aux sites de frai et donc aux femelles, menant ainsi à un plus haut taux de fertilisation des œufs. En effet, les individus agressifs étaient plus proches du site de frai, assurant alors que leurs spermatozoïdes soient libérés sur les œufs (Uematsu et Yamamori 1982 ; Skinner, 2004). L'analyse portait sur l'agressivité des mâles, mais certaines études ont montré des différences d'agressivité en fonction du sexe (Filby *et al.*, 2010 ; Norton *et al.*, 2011 ; Dahlbom *et al.*, 2011).

Dans le cadre évolutif, Ariyomo et son équipe (2013) ont investigué la variance génétique additive de l'agressivité et l'audace chez le poisson zèbre dans le but d'estimer l'héritabilité. La variance génétique additive est une composante de la variance génétique correspondant à une partie de la variance phénotypique qui est due aux effets additifs de tous les allèles.

L'estimation de l'héritabilité est réalisée en mesurant la similitude entre les parents et est souvent exprimée comme la proportion de la variance qui peut être attribuée à la variance

génétique additive (Falconer et Mackay, 1996 ; Wilson *et al.*, 2009). L'étude leur a permis de découvrir que l'estimation de l'héritabilité pour l'agressivité était plus faible que celle pour l'audace. Cela suggère que l'agressivité est soumise à une pression sélective plus élevée chez cette lignée de poisson-zèbre (Hoffmann, 1999 ; Careau *et al.*, 2011). En effet, la sélection favorise les allèles qui permettent d'avoir le meilleur fitness. Donc les traits qui sont sous une forte pression sélective auront peu ou pas de variance génétique additive du fait que les allèles sélectionnés deviennent fixés dans la population, menant donc à une estimation faible d'héritabilité (Jones, 1987 ; Merilä et Sheldon, 1999 ; Hoffmann, 1999 ; Stirling *et al.*, 2002). Etant donné l'importance que l'agressivité peut avoir chez les poissons comme chez le zebrafish, l'environnement social peut avoir un impact plus important sur la variance phénotypique de l'agressivité (Moore *et al.*, 1997 ; Wolf *et al.*, 1998 ; Wilson *et al.*, 2009 ; McGlothlin *et al.*, 2010). L'agressivité est donc un trait de personnalité important autant évolutivement qu'écologiquement parlant. Celui-ci, en fin de compte, est dépendant de la physiologie propre de l'individu ainsi que des adaptations moléculaires forgées durant l'évolution (Fernald, 2003). Au niveau physiologique, une étude a testé l'hypothèse selon laquelle les corrélations physiologiques de l'agressivité et de la violence suggèrent que certaines psychopathologies liées à l'agressivité sont associées à un faible fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et du système nerveux autonome (SNA). Une fréquence cardiaque plus faible ainsi qu'une température corporelle plus élevée a ainsi été trouvée chez des lignées de souris agressives (Caramaschi *et al.*, 2008). Ce faible fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et du système nerveux autonome (SNA) est probablement lié un changement d'expression de gènes menant à une sur ou sous-production des molécules sous-jacentes à un comportement agressif. Mais quelles molécules sont sous-jacentes à l'agressivité ? Le prochain paragraphe explore cela plus en détail.

2.3.1) Molécules sous-jacentes à l'agressivité.

L'agressivité peut être modulée par différentes molécules (hormones) ou par de multiples voies métaboliques. Étant donné que ce comportement particulier est régulé de manière complexe, seules les molécules les plus étudiées par rapport à l'agressivité seront abordées. Des études neurobiologiques ont identifié un sous-ensemble de zones cérébrales hypothalamiques et limbiques qui ont tendance à faciliter les comportements agressifs chez les rongeurs et les primates. En revanche, l'activité neuronale dans le cortex frontal agit généralement pour inhiber le comportement agressif (Nelson et Trainor, 2007). Chez l'homme, le comportement agressif trouve son origine dans les centres du cerveau déclenchant le système neuroendocrinien qui conduit à l'expression d'un comportement agressif (Batrinos, 2012)

Une première hormone jouant un rôle dans l'agressivité est le cortisol : hormone glucocorticoïde sécrétée par le cortex surrénal en réponse à un stress physique et psychologique (Dickerson et Kemeny, 2004). Chez l'humain, il apparaît qu'à l'adolescence, la faible concentration plasmatique de cortisol a été négativement corrélée à une faible maîtrise de soi (Shoal *et al.*, 2003), à la délinquance et à l'agressivité proactive et réactive (Poustka *et al.*, 2010). De plus, selon une méta-analyse, un grand nombre de données montrent que le cortisol est réduit dans le comportement antisocial (Hawes *et al.*, 2009). La faible concentration de cortisol chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) provoque également une agressivité et une domination sociale accrue (Moreira *et al.*, 2004). Une autre étude a également montré chez le killifish des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) que le cortisol et la testostérone jouent un rôle important dans les corrélations observées entre agressivité et audace chez cette espèce (Chang *et al.*, 2012). Justement, la testostérone est une autre hormone importante. C'est une hormone stéroïde androgène sécrétée par les organes génitaux mâles et chez les mammifères, un haut taux de testostérone est lié à une agressivité accrue (Giammanco *et al.*, 2005).

Aussi bizarre que cela puisse paraître, l'ocytocine peut avoir un effet. C'est une hormone hypothalamique qui régule les comportements sociaux complexes en favorisant l'attachement et en facilitant les interactions sociales (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2011). Les troubles de fonctionnement du système ocytocinergique ont été observés chez les rongeurs avec un comportement agressif (Lubin *et al.*, 2003 ; McMurray *et al.*, 2008). Une plus faible

concentration d'ocytocine dans le système nerveux central représente un facteur de prédisposition au comportement agressif de l'homme (Lee *et al.*, 2009 ; Jokinen *et al.*, 2012).

La voie métabolique de la sérotonine est la dernière connue (chez l'homme) comme ayant un effet sur l'agressivité. La sérotonine joue un rôle clé dans la plupart des troubles psychiatriques et dans la personnalité antisociale/agressive (Nutt, 2008 ; Seo *et al.*, 2008). La réduction de la neurotransmission pour la sérotonine a été liée à un risque plus élevé de comportements agressifs (Davidson *et al.*, 2000). Chez les poissons téléostéens, cette voie intervient lors de la mise en place de la dominance. Le rang social des individus dépend d'interactions agressives pour déterminer qui sera le dominant du dominé (Huntingford et Turner 1987). Le gagnant de cette interaction reste en général agressif et actif alors que le perdant perd son agressivité et se met en retraite du dominant (Øverli *et al.*, 1999 ; Larson *et al.*, 2006). Ces interactions agressives sont stressantes pour les poissons et autant chez les poissons dominant que les dominés, une activation du système serotonergique a été observée (Øverli *et al.*, 1999).

Au regard de ce qui a été présenté, Il existe des mécanismes neurologiques sous-jacent à l'agressivité. Plusieurs d'entre eux ont été repris par Nelson et Trainor (2007) dont l'effet de l'interaction des gènes avec l'environnement. L'agressivité est liée à des hormones elles-mêmes régulées par certains gènes. Ces gènes sont responsables du développement du comportement agressif et peuvent être régulés par des mécanismes que l'on appelle épigénétique. De plus, les facteurs environnementaux des périodes pré et postnatales, comme le stress, la nutrition et les conditions sociales liées au stress, affectent, par le biais de mécanismes épigénétiques, l'expression des gènes associés à un comportement agressif (Tremblay *et al.*, 2018). C'est pourquoi une description plus approfondie des mécanismes épigénétiques est pertinente dans l'optique où ils exercent une influence sur le comportement agressif. C'est le sujet principal développé au chapitre suivant.

2.3.2) Liens potentiels entre agressivité et vieillissement.

Comme discuté dans la partie comportement, les traits de personnalité ont une importance évolutive et écologique. Personne ne sait pourtant à quel point les traits de personnalité comme l'agressivité peuvent influencer le vieillissement. En effet, est-ce qu'après la reproduction l'agressivité entraînera une accélération ou une décélération du vieillissement ? L'agressivité post reproductrice est-elle plus ou moins élevée ? L'agressivité change-t-elle avec l'âge malgré le fait que c'est un trait de personnalité, et qui donc devrait être stable dans le temps ?

De plus, le vieillissement touchant des zones neuronales, peut-être que les voies métaboliques impliquées dans l'agressivité influencent également le vieillissement ou l'inverse. Ce mémoire aura pour but de trouver l'existence ou non d'une corrélation entre agressivité et vieillissement ce qui pourrait mener à de futures recherches pour répondre à ces différents questionnements.

3) Epigénétique

L'épigénétique est un domaine assez récent qui stipule que l'environnement peut changer le phénotype d'un individu sans en altérer le génotype. Mais quel est son origine ?

3.1) Origine

C'est en 1942 que Conrad Waddington définit le terme « Epigénétique » pour la première fois. Selon lui, l'épigénétique est une branche de la biologie qui étudie les interactions causales entre les gènes et leurs produits, ce qui donne naissance au phénotype (Waddington, 1942). Ces interactions ne modifient en rien le génotype des individus. Etymologiquement, « épi » signifie « sur », ce terme reflète la nécessité d'étudier des événements qui sont « au-delà » de la génétique, des événements qui in fine modifieront le phénotype sans changer les gènes (Jablonka et Lamb 2002). Cette définition de l'épigénétique sera utilisée pour décrire les événements non explicables par la génétique (Waddington, 1942 ; Heard, 2013 ; Jablonka et Lamb, 2002)

C'est à partir des années 1990 que l'épigénétique a réellement suscité de l'intérêt et que sa définition a évolué. Le changement de sens donné à l'épigénétique s'est produit au moment où les mécanismes moléculaires contrôlant l'activité des gènes et l'héritage des phénotypes

cellulaires a commencé à être démêlé (Jablonka et Lamb, 2002). En 1990, Holliday, à la suite de ses travaux sur la mémoire cellulaire et la méthylation, définit l'épigénétique comme « l'étude des mécanismes de contrôle temporel et spatial de l'activité des gènes durant le développement d'organismes complexes ». Il ajouta même en 1994 qu'il existerait une couche supérieure d'informations en plus de celle contenu dans l'ADN et que celle-ci est héritable. C'est l'introduction de l'hérédité épigénétique (Holliday, 1994). Un peu plus tard, en 1996, Le champ d'application de l'épigénétique s'est réduit et la notion d'héritabilité épigénétique a été incluse dans la définition. L'auteur du livre « Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation » définit l'épigénétique comme « l'étude des modifications mitotiquement ou méiotiquement hérissables de la fonction des gènes qui ne peuvent pas être expliquées par des changements dans la séquence d'ADN » (Russo, 1996). L'héritage épigénétique qui a été apporté par Holliday marque un changement important par rapport à avant car désormais, l'héritage n'est plus seulement limité à la génétique.

De nos jours, l'héritage épigénétique fait toujours partie de la définition. Une définition plus contemporaine est « les changements dans l'expression d'un gène qui sont méiotiquement et mitotiquement hérissables et qui n'impliquent pas de changements dans la séquence d'ADN sous-jacente » (Deans et Maggert, 2015 ; Riggs et Porter, 1996). La génétique aujourd'hui traite généralement de la transmission et du traitement de l'information dans l'ADN, tandis que l'épigénétique s'occupe de son interprétation et de l'intégration avec des informations provenant de l'environnement (Jablonka et Lamb, 2002).

3.2) Mécanismes épigénétiques

La méthylation de l'ADN fait partie de plusieurs mécanismes considérés comme épigénétiques. C'est le mécanisme le plus étudié parmi eux et celui-ci bénéficiera d'une étude plus approfondie dans le prochain chapitre du fait de son intérêt dans le cadre de ce mémoire.

Un premier mécanisme épigénétique est le remodelage de la chromatine par modification des histones (Stedman et stedman 1950 ; Holliday, 2006 ; Norouzitallab *et al.*, 2019). Chez toutes les cellules eucaryotes, l'ADN est compacté en ce qu'on appelle la chromatine. La chromatine est constituée de briques élémentaires : les nucléosomes (**Figure 5**). Ceux-ci sont constitués d'un cœur octamérique, constitué de protéines appelées histones, autour duquel s'enroule deux tours superhélicaux d'ADN (Gross *et al.*, 2015 ; Fischle *et al.*, 2003). Il existe différentes

histones, celles qu'on appelle de « cœur » et qui s'associent par paires : H2A-H2B et H3-H4. Le cœur octamérique du nucléosome est, en réalité, un assemblage de deux dimère H2A-H2B et d'un tétramère H3-H4. Il existe également les histones de liaison, H1 et H5, qui sont situées en dehors du nucléosome et qui permettent de condenser les gènes entre chaque nucléosome (Arents et Moudrianakis, 1995 ; Lacoste et Côté, 2003 ; Mariño-Ramírez *et al.*, 2006, Norouzitallab *et al.*, 2019). L'ensemble de ces nucléosomes forment ainsi la chromatine (Olins, 2003 ; Kouzarides, 2007 ; Gross *et al.*, 2015). C'est une structure dynamique car celle-ci peut être sous deux formes différentes : une fibre de 10nm ou l'euchromatine qui correspond à l'état actif de la chromatine et une fibre de 30nm ou l'hétérochromatine qui correspond à l'état inactif de celle-ci (**Figure 5**). L'euchromatine est la forme dite active car l'accès à l'ADN par les facteurs de transcriptions est possible alors que ce n'est pas le cas pour l'hétérochromatine (Tang *et al.*, 2015 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Fischle *et al.*, 2003).

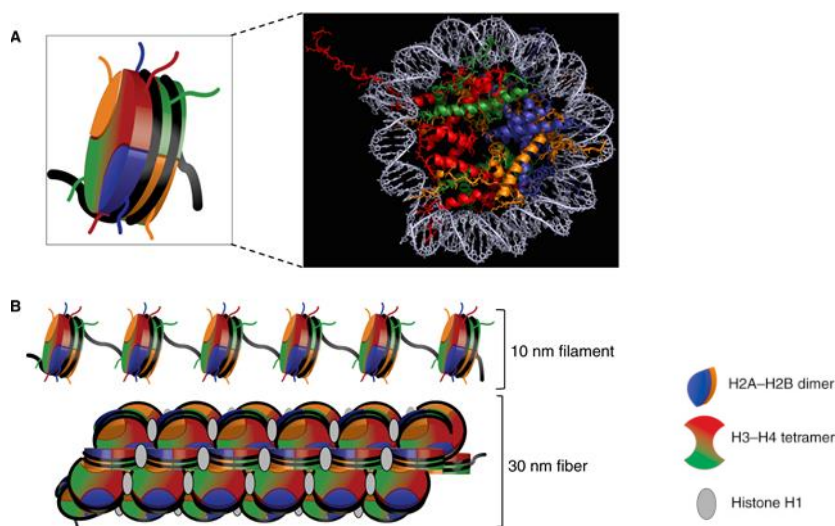


Figure 5 : (A) Représentation du nucléosome. (B) Structures primaires de la chromatine : euchromatine (10nm filament) et hétérochromatine (30nm fiber). Figure adaptée de (Gross *et al.*, 2015)

Les histones possèdent ce qu'on appelle des queues N-terminal. Celles-ci sont composées de d'acides aminés spécifiques sur lesquels des modifications post-traductionnelles peuvent se réaliser. Les plus connues sont les acétylations, méthylations, phosphorylations et ubiquitinations qui ont des effets différents selon la queue N-terminal ciblée (Norouzitallab *et al.*, 2019). En général, l'acétylation est associée à une activation de la transcription, la phosphorylation à une condensation de la chromatine et enfin la méthylation-ubiquitination à une activation/répression de la transcription (Norouzitallab *et al.*, 2019). Les acétylations,

méthylations et phosphorylations peuvent se réaliser sans l'intervention de gènes et être influencés par des facteurs externes au génome, expliquant alors leur caractère épigénétique (Holliday, 2006).

D'autres mécanismes épigénétiques existent et sont regroupés dans les ARN non-codants (ncRNA). Les ARN non-codants sont les ARN qui ne codent pas pour une protéine. Parmi ces ncRNA, il existe les « piwi-interactive RNA » (piRNA). Les piRNAs forment un complexe avec des protéines PIWI qui empêche la transcription (Iwasaki *et al.*, 2015). D'autres ncRNA, plus petits, comme les micros-RNA (miRNA) peuvent s'attacher à l'ARN messager et dès lors inhiber la traduction (Relton et Smith, 2010 ; Heid, 2018). L'expression de ces ncRNA peut être modifiée par des facteurs externes comme des organismes pathogène ou alors certains miRNAs peuvent directement provenir de cellules étrangères à notre organisme et influencer l'expression des gènes (Heid, 2018)

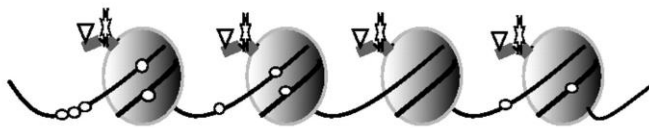
3.2.1) Méthylation de l'ADN

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN se réfère au transfert d'un groupe méthyl (-CH₃) depuis un S-adenosyl-L-méthionine sur les cytosines du 5^{ème} carbone de la pyrimidine. Cela forme la 5-méthylcytosine (5mC) ou la forme méthylée de la cytosine. Cette réaction est catalysée par des DNA méthyltransférases (DNMTs) (Christman, 2002 ; Holliday et Pugh, 1975 ; Jang *et al.*, 2017 ; Moore *et al.*, 2013). Trois familles de ces enzymes ont été décrites chez les vertébrés : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (Campos *et al.*, 2012 ; Goll et Bestor, 2005). L'enzyme DNMT2 existe aussi, toutefois, son rôle est moins étudié et son activité quant à la méthylation de l'ADN est faible. Cette enzyme serait plutôt impliquée dans la méthylation des ARNs de transfert (Jeltsch *et al.*, 2006). La DNMT1 est responsable de la restauration de la méthylation de l'ADN après la réplication tandis que les DNMT3 catalysent la méthylation de novo (Zhang et Xu, 2017, Campos *et al.*, 2012). La majorité des méthylations se passent sur des dinucléotides « cytosine-phosphate-guanine » plus communément appelées « CpG » (Klose et Bird, 2006, Klimasauskas *et al.*, 1994 ; Moore *et al.*, 2013).

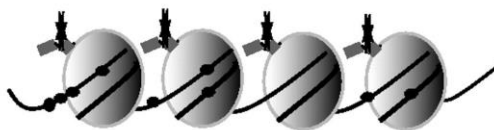
La méthylation peut se réaliser à différents endroits du génome comme sur les séquences répétées, les rétrotransposons ou encore les séquences intergéniques. Il existe des séquences à fortes densités en CpG que l'on appelle des îlots CpG. Celles-ci se retrouvent généralement au niveau des promoteurs et ces îlots CpG peuvent réguler l'expression des gènes quand ils

sont méthylées (Angers *et al.*, 2010 ; Deaton et Bird, 2011 ; Jones et Takai, 2001). La méthylation d'îlots CpG est en fait associée à la régulation génétique et plus précisément à la répression. Concrètement, le groupement méthyl se lie à l'ADN provoquant alors une modification de celui-ci. Cette modification empêche la reconnaissance de l'ADN par certains enzymes ou facteurs de transcriptions. Cette modification peut cependant permettre la liaison des « methylated DNA binding proteins » (MBPs) qui vont alors recruter les enzymes histones desacetylase (HDAC) menant à la compaction de la chromatine sous forme d'hétérochromatine (**Figure 6**) (Diane *et al.*, 2011 ; Bender, 2004 ; Wu *et al.*, 2011). De manière générale, une hyperméthylation des îlots CpG situés sur un promoteur diminuera l'expression génétique alors qu'une hypométhylation l'augmentera (Huang et Fan 2010 ; Moore *et al.*, 2013)

Active Chromatin



Inactive Chromatin










- | | |
|--|---|
|  nucleosome |  Acetyl-lysine |
|  histone tail |  Methyl-lysine--activating |
|  CpG |  Methyl-lysine--inactivating |
|  Methyl CpG | |

Figure 6 : Marqueurs épigénétiques et structure de la chromatine. Les dinucléotides CpG sont distribués inégalement dans l'ADN et peuvent se retrouver en îlots CpG tout en cachant potentiellement des parties promotrices. La méthylation des dinucléotides CpG est associée avec l'hétérochromatine. Adapté de Diane *et al.*, 2011

La méthylation des îlots CpG pourrait cependant dans certains cas stimuler l'expression de gènes. A travers cette stimulation, il serait possible d'atteindre différents objectifs comme le maintien de la transcription de gènes impliqués dans des mécanismes biologiques essentiels ainsi que dans la maintenance de fonctions cellulaires basales (Foret *et al.*, 2009). Quant à l'hypo-méthylation des îlots CpG, il apparaît que celle-ci aurait tendance à être exprimé dans de nombreux tissus et de manière plus forte (Du *et al.*, 2012).

La méthylation de l'ADN n'est pas unidirectionnelle, elle est dynamique et réversible par déméthylation. La déméthylation peut se réaliser soit de manière passive à la suite de la division cellulaire et à la suite de l'absence de DNMT1 (Wu et Zhang 2011), soit de manière active par le biais de la thymine DNA glycosylase (TDG) ou par hydroxyméthylation (Gu *et al.*, 2011 ; Masser *et al.*, 2018 ; Rai *et al.*, 2008 ; Wu et Zhang 2017).

L'hydroxyméthylation de l'ADN est un mécanisme qui consiste à l'ajout d'un groupement hydroxyméthyle sur une méthylcytosine (5mc) pour former la cytosine hydroxyméthylée (5-hmc). Cette molécule est capable de retirer un groupement méthyl sur une cytosine méthylée (Grayson et Guidotti 2013 ; Globisch *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2014). Cette marque épigénétique est régulée par des enzymes : les « Ten-eleven translocation » (TET). Ces enzymes catalysent la réaction d'oxydation du 5mc en 5-hmc et sont divisés en 3 familles : TET1, TET2 et TET3 (Wu et Zhang 2011 ; Tang *et al.*, 2015). L'hydroxyméthylation est particulièrement abondante dans les tissus cérébraux par rapport à d'autres tissus/organes (Lister *et al.*, 2013). En plus de la méthylation et de l'hydroxyméthylation, des modifications beaucoup plus rares comme la formylcytosine (fC) et de la carboxylcytosine (caC) existent également (**Figure 7A**) (He *et al.*, 2011 ; Ito *et al.*, 2011).

La méthylation de l'ADN est en réalité un cycle dynamique de méthylation-déméthylation (Masser *et al.*, 2018) (**Figure 7B**). Les ADN méthyltransférases (DNMT) ajoutent des groupes méthyles dans lesquels les Tet méthylcytosine dioxygénases (TETs) oxydent séquentiellement les modifications réalisées auparavant pour revenir à une cytosine non modifiée ou ces modifications sont incluses dans la réparation par excision de base par la thymine ADN glycosylase (TDG) (Masser *et al.*, 2018)

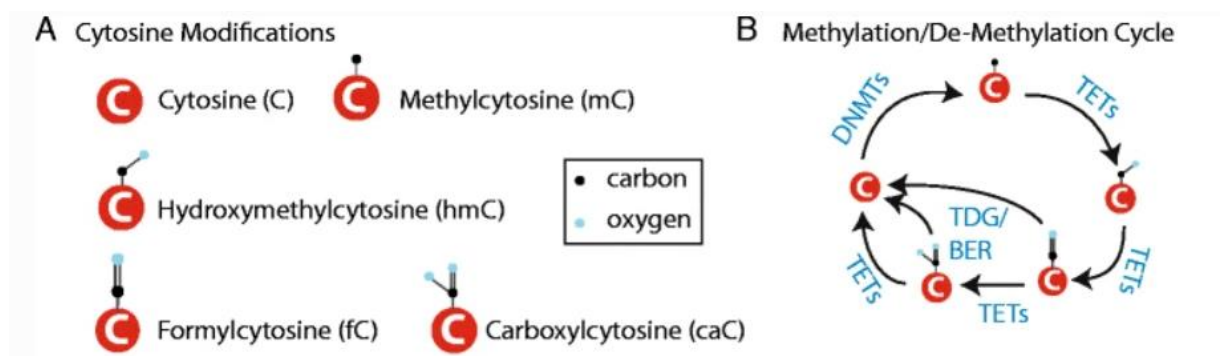


Figure 7 : Principes fondamentaux des modifications de l'ADN. A) Les bases de la cytosine existent sous une forme non modifiée et sous une forme méthylée, hydroxyméthylée, formylée et carboxylée. B) cycle de méthylation et dé-méthylation. Adapté de Masser *et al.*, 2018.

L'aspect épigénétique de ce mécanisme est clairement dû à la méthylation de novo. En effet, des facteurs externes (environnementaux par exemple) peuvent enclencher ce mécanisme. L'enzyme DNMT1 peut transmettre ces méthylations de novo lors de la réplication de l'ADN. Pour résumer, la méthylation de l'ADN est un marqueur épigénétique qui a un caractère réversible et peut être héritable (Jones et Takai, 2001 ; Zhang et Xu, 2017 ; Bird, 2002 ; Holliday, 2006).

Pour illustrer concrètement l'effet épigénétique de la méthylation de l'ADN, prenons le cas des abeilles. Dans une ruche, toutes les abeilles ont presque un ADN identique. Il existe malgré cela des différences phénotypiques entre la reine et les ouvrières. Cette différence provient d'un nourrissage différentiel des larves. En effet, certaines larves destinées à devenir reines seront nourries avec de la gelée royale alors que d'autres non. Dans cette gelée, il y a différents éléments à effets hypométhylants. Un facteur externe (la gelée royale) va induire une répression en inhibant DNMT3 et une activation de certains gènes par le biais de la méthylation. Cela induira une expression différente des gènes chez ces individus et donc une différence phénotypique (reine) (Lyko *et al.*, 2010).

Après avoir longuement discuté de la méthylation de l'ADN, il faut tout de même préciser que ce n'est pas la seule qui existe. Il y a peu, des découvertes ont été faites sur les méthylations non-CpG. Le mécanisme n'est pas bien connu à ce jour mais une chose est sûre, c'est que ces méthylations non-CpG se portent sur des cytosines suivies soit par des adénines, thymines ou encore d'autres cytosines (Jang *et al.*, 2017). Ce type de méthylation est catalysé par DNMT3a et DNMT3b (Laurent *et al.*, 2010). Il a été récemment montré que les méthylations non-CpG sont également corrélées à l'expression de gènes comme la myogenin chez la souris (Fuso *et al.*, 2010) et Presenilin1 chez l'homme (Fuso *et al.*, 2015 ; Monti *et al.*, 2020). Ces méthylations non-CpG s'organisent et s'accumulent au cours du neurodéveloppement dans le cerveau humain de sorte que dans le tissu neuronal, la méthylation non-CpG est maintenue jusqu'au vieillissement et peut atteindre plus de 50% de la méthylation totale (Lister *et al.*, 2013). Cette forme de méthylation pourrait représenter le type principal de méthylation se produisant dans le cerveau humain. De plus, ce mécanisme modulerait l'expression des gènes dans le cerveau et ces gènes en question seraient plus sujets à des facteurs environnementaux comme par exemple, le régime alimentaire. Cela mènerait alors à des processus neurodégénératifs. (Fuso et Lucarelli, 2019).

3.3) Lien entre épigénétique et vieillissement

L'épigénétique peut, étant donné sa capacité à modifier l'expression des gènes, influencer de nombreux processus cellulaires dont le vieillissement fait partie (Calvanese *et al.*, 2009). Comme mentionné auparavant, l'épigénétique fait partie de ce qu'on appelle les « hallmarks of aging » (López-Otín *et al.*, 2013). Pour illustrer cela, prenons l'exemple de jumeaux. En plaçant des jumeaux dans deux environnements différents, l'un sera différent phénotypiquement de l'autre notamment à cause des modifications épigénétiques qu'il subit en vieillissant dans cet environnement plutôt qu'un autre (Pal et Tyler, 2016). Mais quels sont les effets épigénétiques liés à l'âge ?

Tout d'abord, il a été prouvé, sur les animaux modèles utilisés dans la recherche sur le vieillissement ; une perte des histones couplé au remodelage global ou local de la chromatine, un déséquilibre des modifications activatrices ou répressives des histones ainsi qu'un changement transcriptionnel est observé avec l'âge (Sen *et al.*, 2016). La **figure 8** représente les différentes marques épigénétiques connues par rapport au vieillissement chez les mammifères. Parmi eux, le mécanisme épigénétique lié au vieillissement le plus étudié est la méthylation de l'ADN (Jang *et al.*, 2017). À la suite des nombreuses études à ce sujet, un concept important liant méthylation d'ADN et vieillissement a été développé : c'est ce qu'on appelle l'horloge épigénétique (Sen *et al.*, 2016 ; Bell *et al.*, 2019).

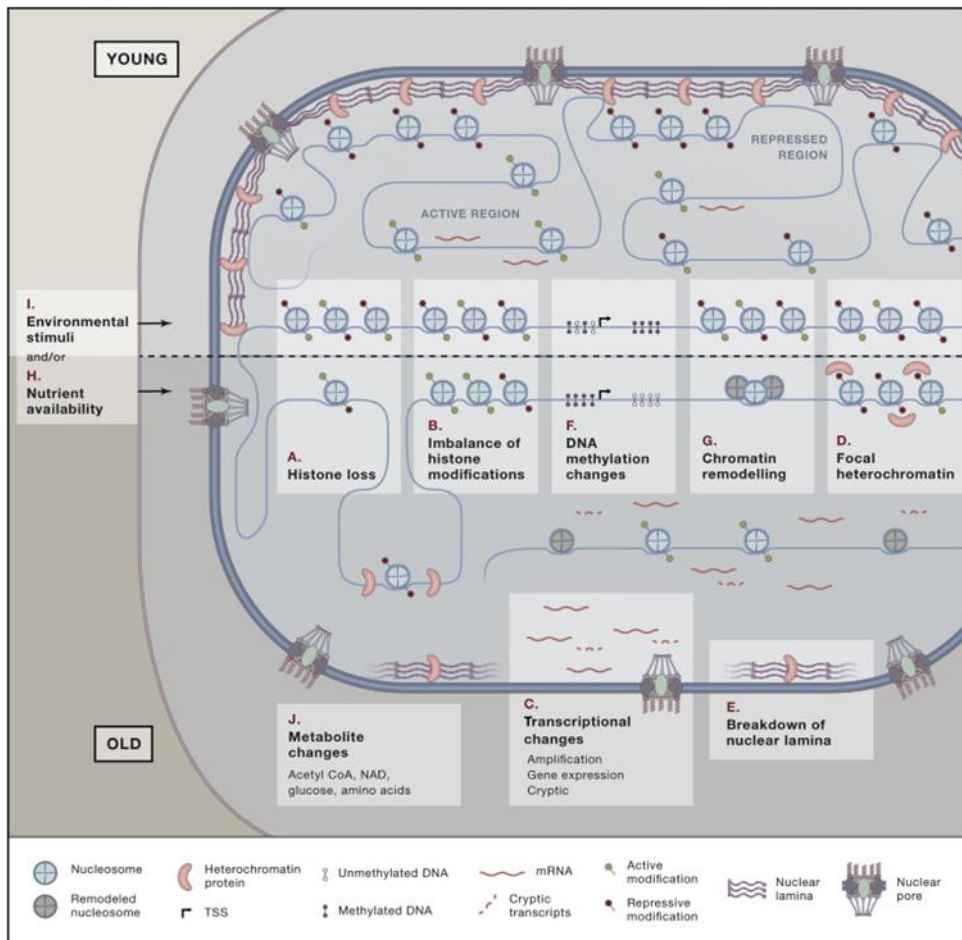


Figure 8 : Les caractéristiques épigénétiques de la sénescence et du vieillissement : la perte d'histones, (B) un déséquilibre des modifications activatrices et répressives, (C) des changements transcriptionnels, (D) pertes et gains en hétérochromatine, (E) dégradation de la lamelle nucléaire, (F) hypo-méthylation globale et hyper-méthylation focale, et (G) remodelage de la chromatine. Ces changements sont fortement dictés par (H) les stimuli environnementaux et (I) la disponibilité des nutriments qui, à leur tour, (J) modifient les concentrations intracellulaires des métabolites. Issu de (Sen et al., 2016)

L'horloge épigénétique constitue un ensemble de sites CpG dont Les niveaux de méthylation de l'ADN mesurent l'âge du sujet. Avec l'âge, les patterns de méthylation changent (Bell et al., 2019). L'horloge épigénétique est donc un moyen d'estimation construit à partir de la méthylation de l'ADN fortement corrélés avec l'âge pouvant quantifier précisément un phénotype lié à l'âge (Horvath et Raj, 2018 ; Bell et al., 2019). Par exemple, il a été démontré que le tabagisme entraîne des changements de méthylation associé à la mortalité prédictibles (Zhang et al., 2017). Jusqu'aujourd'hui, des corrélations ont été réalisées entre le vieillissement et la méthylation de l'ADN. Cependant, la question de savoir si les modifications de la méthylation de l'ADN peuvent entraîner le vieillissement de l'organisme n'est pas encore résolue (Niehrs et Calkhoven, 2019) bien qu'une étude ait montré l'effet causal entre hyperméthylation et vieillissement (Schafer et al., 2018). L'étude de la méthylation de l'ADN

de différents gènes en fonction de l'âge est dès lors importante pour établir le possible lien causal existant avec le vieillissement.

4) Voie métabolique des Toll like receptor (TLR)

Notre système immunitaire se base sur deux composants : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, en première ligne de mire, se base sur un réseau de cellules allant des macrophages jusqu'aux basophiles (Shaw *et al.*, 2011). Leurs rôles sont de défendre le corps contre des organismes pathogènes sur base de la reconnaissance de modèles moléculaires. Ces cellules reconnaissent différents types de modèles, les microbe-associated molecular patterns (MAMPs) ou les pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Ces modèles sont composés de lipides, lipoprotéines, protéines et acides nucléiques (Akira *et al.*, 2006 ; Brubaker *et al.*, 2015). Les TLR sont des récepteurs moléculaires portés par ces cellules du système immunitaire inné et sont essentiels dans la protection de l'hôte contre les microorganismes pathogènes ou les menaces endogènes (Hung *et al.*, 2018). Les TLRs sont définis comme une classe de récepteurs appelés « pattern recognition receptors » (PRRs) qui initie le processus de défense immunitaire innée en reconnaissant les modèles moléculaires associées à différents agents pathogènes (Wallet *et al.*, 2018 ; Nie *et al.*, 2018). La première découverte du gène Toll, prototype des TLRs, sur la drosophile (*Drosophila melanogaster*) a montré que ce gène contrôlait la polarité de l'axe dorso-ventral lors de l'embryogenèse (Anderson *et al.*, 1985). En 1996, en plus de cette polarité dorso-ventrale, la voie Toll-dépendante a été associée à la synthèse de peptides antimicrobiens chez les mouches adultes (Lemaitre *et al.*, 1996). Les TLR ont été découverts l'année d'après, en 1997 (Medzhitov *et al.*, 1997). Par la suite, ils ont été largement étudiés au niveau de l'immunité innée chez les invertébrés et chez les animaux, des insectes à l'homme (Nie *et al.*, 2018).

L'importance des TLRs ne réside pas seulement dans la reconnaissance des PAMPs et MAMPs mais également dans la cascade métabolique qui s'en suit. En effet, de nombreux rôles ont été associés avec les TLRs comme la reconnaissance des antigènes propres à notre corps et ceux venant de l'extérieur, la détection des agents pathogènes envahissants, la passerelle entre l'immunité innée et adaptative et la régulation de la production, la prolifération et la survie des cytokines (Vidya *et al.*, 2018 ; Bhattacharyya *et al.*, 2018 ; Ruyschaert *et al.*, 2015). En réalité, ces rôles sont médiés par des voies de signalisation déclenchées lors de la liaison

des TLRs avec leurs différents ligands, entraînant alors la production de cytokines et chimiokines. Il existe deux voies de signalisation des TLR : la voie de la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 dite MyD88 dépendante et celle de l'adaptateur contenant le domaine TIR induisant l'IFN β dite TRIF dépendante (Akira *et al.*, 2004 ; Barton et Kagan, 2009). Par le biais de ces deux voies de signalisation, les voies dépendantes de NF- κ B seront activées et induiront la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires (Shuang *et al.*, 2015).

Comme vu auparavant, le vieillissement touche tous les niveaux biologiques et entre autres le système immunitaire. En effet, c'est un système physiologique montrant des changements marqués au cours du vieillissement (Fulop *et al.*, 2017 ; Franceschi *et al.*, 2017). Une baisse de deux de ces composants : l'immunité adaptative et innée, est associée au vieillissement (Lutz et Quinn, 2012 ; Golomb *et al.*, 2015). Un nouveau concept est apparu à la suite des nombreux changements immunologiques liés à l'âge : l'immunosénescence (Fulop *et al.*, 2014 ; Aiello *et al.*, 2019). Etroitement lié à ce concept, l'inflamm-aging a été mis en avant par Claudio Franceschi et a été décrit comme une inflammation chronique et stérile associée à l'âge (Franceschi *et al.*, 2000). Les TLRs font partie de l'immunité innée et peuvent influencer l'immunité adaptative. Chez l'homme, il semble avoir des preuves d'une dérégulation associée à l'âge de la fonction TLR, entraînant à la fois une activation inappropriée et une altération de la signalisation TLR (Shaw *et al.*, 2011). Par exemple, chez les personnes de plus de 60 ans, différentes régions du cerveau perdent progressivement et lentement des cellules en raison de la surexpression des cytokines, des chimiokines et de la neurotoxicité. Cet état pathologique est présent dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, Parkinson, la sclérose en plaques et la maladie de Huntington (Amor *et al.*, 2010). Cette neurodégénération est notamment associée à la neuroinflammation. Les TLRs sont de plus en plus impliqués dans cette neuroinflammation concernant les troubles cérébraux liés à l'âge (Okun *et al.*, 2011 ; Mattson et Arumugam, 2018). Concrètement, les TLRs activent et signalent des voies en aval comme celle de NF- κ B et celle du pro-IL-1 β , tous les deux responsables de la neuroinflammation associée à une concentration élevée de cytokines. Plus précisément, avec l'âge, la transcription des gènes pro-inflammatoires est régulée à la hausse, par conséquent, la transcription des TLRs également changent et participent ainsi à la neurodégénérescence liée à l'âge (Azam *et al.*, 2019).

4.1) Gènes d'intérêts

Il existe exactement 10 gènes codant pour des TLRs chez l'homme (Du *et al.*, 2000) et 13 chez la souris (Tabeta *et al.*, 2004). Certains sont plus étudiés comme TLR4 (Azam *et al.*, 2019 ; Ghosh *et al.*, 2017) et TLR2. TLR4 et TLR2 auraient leur signalisation en aval altérée avec le vieillissement, ce qui augmenterait la production de TNF α pouvant mener alors à un risque plus élevé de septicémie (Bailey *et al.*, 2019). Chez les poissons téléostéens comme le killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*), 21 gènes de TLR (TLR1-5, 5S, TLR-9, TLR13, 14, TLR18-23, et TLR25-28) ont été identifiés dont les orthologues TLR des mammifères et des TLR spécifiques aux téléostéens (Nie *et al.*, 2018).

Des preuves de plus en plus nombreuses soutiennent l'existence d'un lien entre l'agressivité et le système immunitaire (Takahashi *et al.*, 2018). Chez l'humain, quelques études ont montré une corrélation positive entre la circulation de certaines cytokines pro-inflammatoires et l'agressivité (Coccaro *et al.*, 2015, Mommersteeg *et al.*, 2008). La voie métabolique des TLRs ne comporte pas seulement des récepteurs mais également des protéines intermédiaires pour d'autres voies métaboliques. La protéine d'interaction TOLL (TOLLIP) par exemple joue un rôle important dans la voie de signalisation des cytokines de l'interleukine (IL-1) contrôlant les réactions pro-inflammatoires en réponse à une blessure (Luiz *et al.*, 2014). Récemment, Alessandra Carion (2020) a découvert lors de sa thèse une forte corrélation entre l'agressivité de l'espèce *Kryptolebias marmoratus* et le niveau de méthylation (augmentant de 40% chez les poissons agressifs vs non-agressifs) de la région promotrice de TOLLIP.

C'est désormais presque une certitude que les TLRs jouent un rôle dans l'immunosénescence. Cependant, aucune expérience n'a été réalisée sur l'effet que pourrait avoir la méthylation de ces gènes dans le processus du vieillissement. En effet, ces gènes, avec l'âge, pourraient changer de niveau d'expression par le biais de la méthylation et donc cela altérerait les voies de signalisation qui en dépendent. Une étude de l'évolution du profil de méthylation/expression des parties promotrices ou intragénique du TLR2, TLR5, TLR7 et TLR9 et TOLLIP seraient intéressante d'une part par rapport au vieillissement mais également pour tester l'hypothèse selon laquelle l'agressivité est corrélée avec la voie TLR chez une espèce différente de *Kryptolebias marmoratus*. Le choix s'est porté sur ces gènes car ceux-ci étaient disponible sur la plateforme *Genome Browser* du killifish turquoise créé par le Leibniz Institute on Aging-Fritz Lipmann Institute (Reichwald *et al.*, 2015). Etant dans le cadre d'une recherche

fondamentale, l'analyse de ces différents gènes par rapport au vieillissement chez *Nothobranchius furzeri* fournira de nouvelles données. Pour réaliser ce genre d'investigation, il faut faire soit de longues expériences (car l'étude se porte sur le vieillissement) ou soit utiliser un animal modèle qui permettrait de réduire le coût et le temps de l'expérience. Justement, il en existe un qui est particulièrement intéressant dans les études sur le vieillissement : le *Nothobranchius furzeri*.

5) Nothobranchius furzeri

Phylogénétiquement parlant, *Nothobranchius furzeri* est un actinoptérygien de l'ordre des Cyprinodontiformes (Genade *et al.*, 2005 ; Costa, 2018) repris dans la famille Nothobranchiidae (Furness *et al.*, 2015a). Cette famille fait partie du sous ordre des Aplocheiloidei qui reprend également la famille des Rivulidae, comportant plusieurs espèces de killifish sud-américain (Costa, 2018). Le genre *Nothobranchius* comprend de nombreuses espèces (plus de 70) dont fait partie le *Nothobranchius furzeri* (Cellerino *et al.*, 2016 ; Costa, 2018 ; Dorn *et al.*, 2011).

Le killifish turquoise, *Nothobranchius furzeri*, est un poisson mesurant entre 3 et 15 cm de long (typiquement <7cm) et montrant un dimorphisme + dichromatisme sexuel marqué (Valdesalici et Cellerino, 2003 ; Baumgart *et al.*, 2015 ; Reichard *et al.*, 2009). Les mâles sont en général plus grands et plus robustes que les femelles et disposent d'une palette de couleurs comparé aux femelles plus ternes et brunâtres (**Fig9c**). Ces couleurs chez le mâle seraient apparues à la suite d'une sélection sexuelle (Reichard *et al.*, 2009 ; Wildekamp, 2004). Les mâles peuvent cependant porter des couleurs différentes en fonction de leur origine. Les mâles de la souche GRZ possèdent des écailles colorées d'un gris bleuté avec des bords rouges ainsi qu'une bande de couleur jaune et une autre noire sur la queue (**Fig9b**). Alors que ceux de la souche MZM, malgré qu'ils puissent également porter la bande de couleur jaune, montrent généralement une bande rouge au niveau de la nageoire caudale (**Fig9a**) (Cellerino *et al.*, 2016 ; Dorn *et al.*, 2011). Les populations de souche GRZ et MZM doivent leur nom au lieu de leur découverte étant le parc national Gona Re Zou au Zimbabwe (GRZ) pour l'un et le Mozambique pour l'autre (MZM) (Reichard et Polačik, 2019). Ces souches sont désormais utilisées en laboratoires. La souche GRZ ne provient que d'un échantillonnage de ces poissons en 1968 (Jubb, 1971). Ces spécimens sont depuis élevés sans hybridation (Genade *et al.*, 2005),

les populations captives sont donc presque homozygote dû à un haut taux de consanguinité (Platzer et Englert, 2016 ; Reichwald *et al.*, 2015 ; Valenzano *et al.*, 2015). Concernant la souche MZM, plusieurs récoltes ont été effectuées, une en 2004 et une en 2012, dans le but d'éviter ce problème homozygotie (Cellerino *et al.*, 2016).

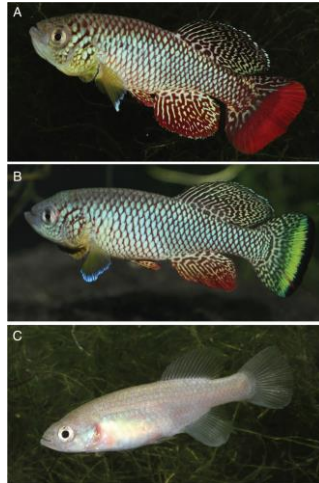


Figure 9 : Mâles adultes à nageoire caudale rouge (A), jaune (B) et femelles (C) de l'espèce *Nothobranchius furzeri* (Cellerino *et al.*, 2016)

5.1) Habitat et mode de vie

Le killifish turquoise vit dans des mares ou bassins d'eaux temporaires dans le sud-est de l'Afrique entre le Soudan et l'Afrique du Sud (Genade *et al.*, 2005). L'eau dans laquelle on le retrouve est généralement stagnante et contient souvent les fèces de grands mammifères comme les éléphants ou les vaches d'élevage (Genade *et al.*, 2005 ; Reichard *et al.*, 2009). *N. furzeri* se développe bien dans les eaux turbides et peu profondes avec une conductivité de l'eau comprise entre 50 et 625 mS cm⁻¹. De plus, il semble préférer un substrat légèrement boueux ou sableux (Cellerino *et al.*, 2016, Reichard *et al.*, 2009).

Le killifish turquoise est un poisson carnivore généraliste qui se nourrit principalement d'invertébrés de diverses espèces malgré son faible pour les crustacés comme les copépodes (Polacik et Reichard, 2010). En laboratoire, ils sont le plus souvent nourris avec des larves de *Chironomus* ou avec des individus *Tubifex sp.*, *Artemia salina* et *Daphnia sp.* (Cellerino *et al.*, 2016).

N. furzeri vit dans des points d'eaux temporaires en moyenne 75 jours par an (Cellerino *et al.*, 2016). Cet environnement l'a amené à adopter un mode de vie assez particulier.

Effectivement, il se développe très vite et meurt très tôt. En moyenne, il vivra de 3 à 6 mois en fonction des souches autant dans la nature que dans un laboratoire où les conditions d'élevage sont stables. (Genade *et al.*, 2005 ; Valdesalici et Cellerino, 2003 ; Cellerino *et al.*, 2016).

5.2) Cycle de vie

Les mares que peuplent les *N. furzeri* comportent souvent moins de mâles que de femelles avec en moyenne 1 mâle pour 3 femelles (jusqu'à 1 mâle pour 10 femelles) (Reichard *et al.*, 2009). Les mâles sont donc très territoriaux et agressifs envers les autres mâles. A maturité sexuelle (3 ou 4 semaines après éclosion), les killifish turquoises peuvent se reproduire chaque jour (Cellerino *et al.*, 2016). Les mâles peuvent s'accoupler avec plusieurs femelles et celles-ci déposent un œuf unique par évènement d'oviposition sur un substrat boueux. En répétant cet évènement, les femelles peuvent pondre jusqu'à 50 œufs par jour. De plus, le taux de fécondité augmente avec l'âge avec plus d'un œuf sur deux fécondé après 6 semaines (Blažek *et al.*, 2013 ; Cellerino *et al.*, 2016 ; Reichard *et al.*, 2009).

La dessiccation annuelle de l'habitat dans lequel vivent les *Nothobranchius furzeri* les ont menés à adapter leur cycle de vie. En effet, les œufs peuvent rester sur le substrat des mares après assèchement contrairement aux adultes (Reichard *et al.*, 2009). Cela est possible grâce à un phénomène appelé diapause embryogénique qui consiste en 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 et Shaw, 2000). Les œufs du *N. furzeri* passent par trois états de diapauses (Genade *et al.*, 2005, Cellerino *et al.*, 2016). La première diapause (diapause I) se déroule à la fin de du stade blastula, lors de l'épibolie où les micromères recouvrent progressivement les macromères. L'œuf rentre dans cet état alors qu'il est encore dans une eau boueuse et peut résister en moyenne 5 jours ou plus si les conditions sont mauvaises. Cette première diapause est notamment causée par l'hypoxie du milieu. La seconde diapause (diapause II) est celle qui peut durer le plus longtemps (de 2 jours à 3 ans) et celle durant laquelle l'œuf est le plus résistant. Elle se déroule après la mise en place des somites et après la morphogenèse du système nerveux (Cellerino *et al.*, 2016, Furness *et al.*, 2015a). Durant cette phase, le métabolisme est diminué de sorte que la synthèse protéique soit diminuée à plus de 93% (Podrabsky et Hand, 2000) et que la consommation d'oxygène soit réduite de 90% (Cellerino *et al.*, 2016 ; Furness *et al.*, 2015). La

dernière diapause (diapause III) se déclenche avant la fin du développement embryonnaire de l'organisme. L'embryon est alors au stade dit *golden eyes* et peut rester dans cet état de plusieurs jours à quelques semaines (Cellerino *et al.*, 2016 ; Furness *et al.*, 2015).

Différents facteurs environnementaux peuvent permettre la rentrée en diapause ou l'éclosion des œufs. La pluie, la température, la luminosité, la photopériode ou encore la présence d'adultes dans la marre peuvent influencer l'éclosion mais différemment en fonction de la diapause des œufs. De plus, l'éclosion se réalise de manière stochastique car même si toutes les conditions sont réunies, elles resteront suffisantes pour permettre l'éclosion mais pas obligatoires. Cela permet d'éviter qu'une petite pluie entre deux moments de sécheresse ne fasse éclore tous les œufs en même temps, les menant alors à leurs morts (Furness *et al.*, 2015).

5.3) Intérêts du *Nothobranchius furzeri*

Dans les études sur le vieillissement, Les premiers modèles étaient des drosophiles (*Drosophila melanogaster*) ou des nématodes (*Caenorhabditis elegans*) car ils possèdent des cycles de vie courts. Mais comme ce sont des invertébrés, il est compliqué d'étendre toutes les découvertes qui leur sont associés avec la compréhension du processus de vieillissement chez les vertébrés (Terzibasi *et al.*, 2007 ; Kumar et Rizvi, 2019). D'autres études ont été menées sur des vertébrés comme des rongeurs (Li *et al.*, 2019), des zebrafish (Kishi, 2014) ou encore des oiseaux (Kumar et Rizvi, 2019) mais cette fois le problème est lié au cycle de vie trop long pour les études. Le meilleur compromis existant à ce jour est un vertébré avec un cycle de vie court, ce qui est le cas du *Nothobranchius furzeri* (Platzer et Englert, 2016 ; Cellerino *et al.*, 2016). Comme vu précédemment, ce poisson peut avoir une espérance de vie de seulement 3 mois en laboratoire avec la souche GRZ, donc un vieillissement très rapide. C'est un modèle propice pour l'étude du vieillissement car il présente tous les phénotypes de vieillissement connu chez d'autre vertébrés et mammifères tel que la sénescence, la déformation de la colonne vertébrale, le développement de cancers, perte de mobilité, de poids ainsi qu'une perte de couleur (Terzibasi *et al.*, 2008). Son génome a été totalement séquencé (Reichwald *et al.*, 2009, Reichwald *et al.*, 2015), ce qui permet de nombreuses manipulations génétiques (CRISPR/CAS9) sur les gènes et les voies sous-jacentes au vieillissement (Platzer et Englert, 2016). Il est déjà utilisé par exemple pour l'étude de la neurodégénération lié à l'âge (Tozzini *et al.*, 2012 ; Baumgart *et al.*, 2014 ; Terzibasi *et al.*,

2007). Des biomarqueurs associés à ce vieillissement rapide ont également été identifiés comme la lipofuscine et β -galactosidase (Terzibasi *et al.*, 2007, Terzibasi *et al.*, 2009).

En plus de tout cela, cette espèce est utile pour investiguer des questions écologiques et évolutives. Evolutivement, il a été prouvé que la pression sélective des mares temporaires a engendré une durée de vie plus courte et un vieillissement plus rapide chez les poissons annuels africains comme le *Nothobranchius furzeri* (Blazek *et al.*, 2017). Ecologiquement parlant, cette espèce est intéressante car elle possède un développement rapide et des diapauses (Blazek *et al.*, 2013). Il est même possible d'investiguer le point de vue comportementale car il existe des variations de traits de personnalité entre les individus *N. furzeri* (Thoré *et al.*, 2018). C'est donc un animal modèle de choix qui est désormais utilisé dans une série de domaines de recherche biomédicale, en écologie et en biologie de l'évolution (Polacik *et al.*, 2016). Son utilisation comme animal modèle fait particulièrement sens dans l'étude du vieillissement chez les vertébrés (Hu et Brunet, 2018).

6) Objectif du mémoire

L'objectif principal de ce mémoire sera d'étudier l'évolution du comportement agressif au cours du vieillissement ainsi que de déterminer si des gènes du TLR pathway subissent une modification de leurs niveaux de méthylation et d'expression dans le cerveau durant le processus de vieillissement chez le *Nothobranchius furzeri*.

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

6.1) Objectifs spécifiques

6.1.1) Agressivité en fonction de l'âge

Un référentiel sur l'agressivité sera réalisé en fonction des différents stades de vie de *Nothobranchius furzeri*. Un test d'agressivité nommé MIA (mirror induced aggressivity) sera effectué sur des spécimens juvéniles, adultes et vieux afin d'observer si d'éventuelles individualités, concernant l'agressivité, existent chez *Nothobranchius furzeri*. Le but principal sera de tester le niveau d'agressivité des poissons pendant leur vieillissement. De plus, des caractères morphologiques seront pris à chaque stade de vie.

6.1.2) Méthylation des gènes du TLR pathway en fonction de l'âge

Un référentiel épigénétique sera réalisé sur les cinq gènes provenant du TLR pathway. Un pyroséquençage permettra d'obtenir des pourcentages de méthylations concernant des zones choisies riches en CpG à différent stades de vies du poisson.

6.1.3) Expression relative des gènes du TLR pathway en fonction de l'âge

Un référentiel génétique sera réalisé sur cinq gènes choisies du TLR pathway. Une qPCR permettra d'obtenir l'expression relative de ces gènes par rapport à des gènes de référence dans le but de comparer leur niveau d'expression en fonction de l'âge.

Matériel et méthode

Le spécimen utilisé dans le cadre de ce mémoire est le *Nothobranchius furzeri*. Les intérêts de ce poisson ont été décrits dans la partie introductive. Lors de cette étude, des mesures d'agressivité ainsi que la taille de vingt mâles ont été caractérisées à 5, 9, 13, 17 et 21 semaines post-éclosion (wph). Les autres caractéristiques morphologiques ont été recueillies en semaine 21 sur les quatorze poissons survivants testés en comportements. Pour la partie épigénétique ainsi que celle concernant l'expression relative, seuls les quatorze individus mâles testés ont été analysés.

1) Elevage et maintien de la lignée de killifish

Lors de la réalisation de ce mémoire, la lignée GRZ de killifish turquoise a été utilisée. La lignée initiale utilisée pour l'élevage provient d'individus fournis en 2018 par l'équipe du laboratoire du Dr Dario Valenziano du Max Planck Institute. Depuis, l'élevage est maintenu et la reproduction a engendré plusieurs générations. Dans ce travail, la génération F6 sera étudiée.

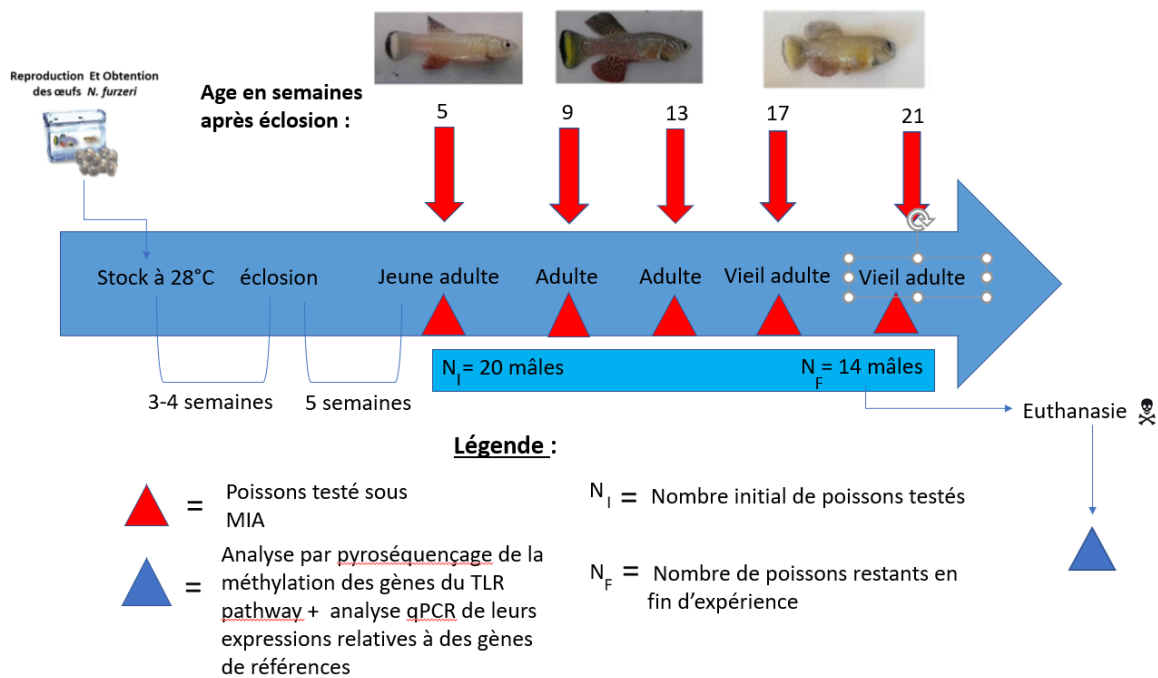
1.1) Système d'élevage

Nos poissons d'élevages sont maintenus dans un système fermé de type « stand-alone ». Ce système est composé d'un ensemble d'aquariums individuels rectangulaires (30x20x15cm) avec un renouvellement continu de l'eau. Un système de recyclage avec des filtres chimiques, physiques et biologique, permet de récupérer les eaux usées. Les paramètres physico-chimiques des différents aquariums sont surveillés. L'eau du système est de l'eau reconstituée composée de sel (InstantOcean) et d'eau distillée (RO water Type II) stabilisée à 600 μ S et 27°C. Une fois par semaine, 25% de l'eau du système est remplacée par de la nouvelle et les détritiques des aquariums sont siphonnés.

Pour l'expérience, les poissons ont été élevés dans un système indépendant de la salle d'élevage. Durant les 2 premières semaines post-éclosion, ils sont maintenus dans des bacs individuels de 500 ml. De la semaine 2 à leur mort ils sont placés dans des bacs de 3L. Les bacs sont siphonnés de leurs détritiques 2 fois par semaine et un renouvellement d'eau est effectué.

Deux fois par jour, *ad libitum*, les poissons sont nourris d'*Artemia salina* vivants (matin et après-midi). Ces petits crustacés sont élevés et entretenus dans de l'eau salée au laboratoire. Les *Artemia* sont rincés à l'eau du système avant d'être données aux *N.furzeri*.

2) Design expérimental



3) Mesures de l'agressivité et mesures morphologiques chez

Nothobranchius furzeri

3.1) Analyse comportementale

Pour tester l'agressivité des poissons, un test MIA « Mirror induced aggressivity » a été effectué. Ce test est basé sur la présence d'un miroir qui permet d'évaluer le niveau d'agressivité (Norton et Gutiérrez, 2019). Dix individus par jour ont été testés le lundi et mardi matin à partir de 9H durant chacune des semaines de test et toujours aux mêmes conditions ($\mu S=600$, $T^\circ=27^\circ C$). Les individus sont testés à jeun lors du test dans le but d'éviter un biais comportemental sachant l'influence du comportement digestif sur le comportement journalier (Filosa *et al.*, 2016). Ils sont cependant nourris à la fin du test. Le test est enregistré à l'aide d'une caméra (SONY HDR-CX625) située au-dessus des arènes. De plus, les paramètres physico-chimiques de l'eau sont mesurés avant chaque test.

3.1.1) Mirror-induced aggressivity

Lors de ce test, le poisson est placé dans une arène rectangulaire (20x30x15cm) composée d'une base opaque ainsi qu'un miroir (10x15cm) disposé sur le côté droit (**fig 10**). L'arène est remplie à hauteur de 3 cm d'eau du système à 600 μ S et à 27°C dans le but d'éviter un déplacement vertical du poisson, qui ne serait pas analysable par vidéo. Avant de commencer le test, le poisson est placé dans une chambre d'acclimatation (cylindre en plastique recouvert d'aluminium, **fig 10**) dans l'arène pendant 10min. L'enregistrement est ensuite lancé pendant 15 min. Pendant ce temps, les morsures à l'encontre du miroir sont notés manuellement. Concernant la notation, une lettre a été attribuée à chaque type de comportement agressif dans le logiciel Noldus Ethovision XT 15. A partir de ces données, le logiciel comportemental intègre l'heure exacte de l'exposition de chaque acte et peut dès lors fournir des données quantitatives sur la latence et la fréquence d'exposition des actes agressifs envers le miroir. Pour l'analyse des capsules vidéo sous ce logiciel, un design de l'arène a été réalisé (**fig 10**). Des zones proches, intermédiaires, éloignées ainsi qu'une zone refuge ont été désignées en fonction de la taille moyenne des poissons et leur distance vis-à-vis du miroir. Ainsi un poisson qui s'est approché du miroir à une distance supérieure à une longueur de corps est dans la zone proche. La zone refuge est la zone dans laquelle le poisson ne peut voir son reflet dans le miroir. Pour délimiter les zones proches-intermédiaires-éloignées de la zone refuge, nous avons utilisé des cercles de diamètre = longueur d'un poisson. Le temps passé dans chacune des zones a été quantifié avec le logiciel Noldus Ethovision XT 15. Les variables qui sont récoltées en fin d'expérience sont reprises dans un fichier de données brutes. En plus des données concernant l'agressivité, d'autres variables comme la distance parcourue ou encore la vitesse maximale sont disponibles.

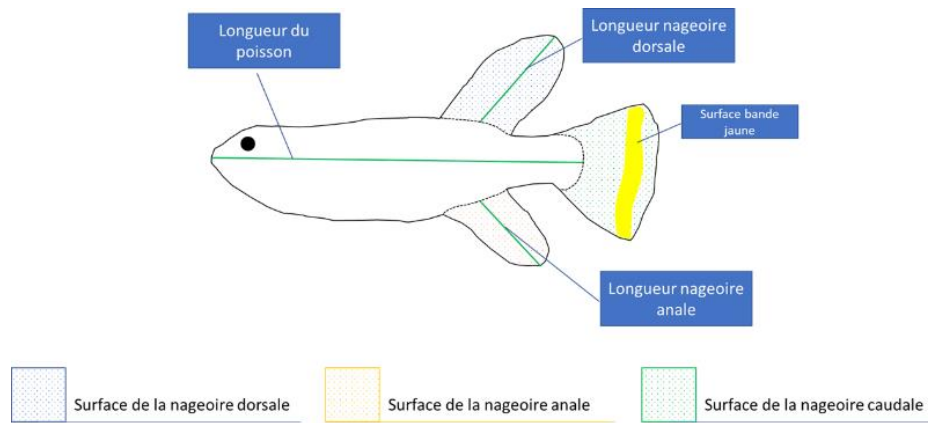


Figure 11 : Schéma représentant les différentes mesures prises sur chacun des individus testés.

3.2.1) Pesée

Les poissons sont pesés directement après la dissection sur une balance de l'ordre du centigramme (Sartorius BP2100S). Pour cela, un récipient en plastique est déposé et taré sur la balance avant que le poisson y soit placé.

3.2.2) Taille des individus

Les poissons sont placés 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 l'appareil photo d'un téléphone de type Samsung galaxy A71. Toutes les photos ont été analysées et mesurées par la suite à l'aide du programme ImageJ (Rasband, 2018).

3.2.3) Aire de la nageoire anale, caudale, dorsale ainsi que du rapport entre l'aire de la bande jaune et celle de la nageoire caudale

Ces mesures ont été effectuées à base des photographies comme celle en figure 11 et réalisées après l'euthanasie. Le placement du poisson se réalise de sorte que chaque nageoire soit bien dépliée pour ne pas fausser la mesure. Les mesures ont toutes également été prises à l'aide du programme ImageJ (Rasband, 2018).

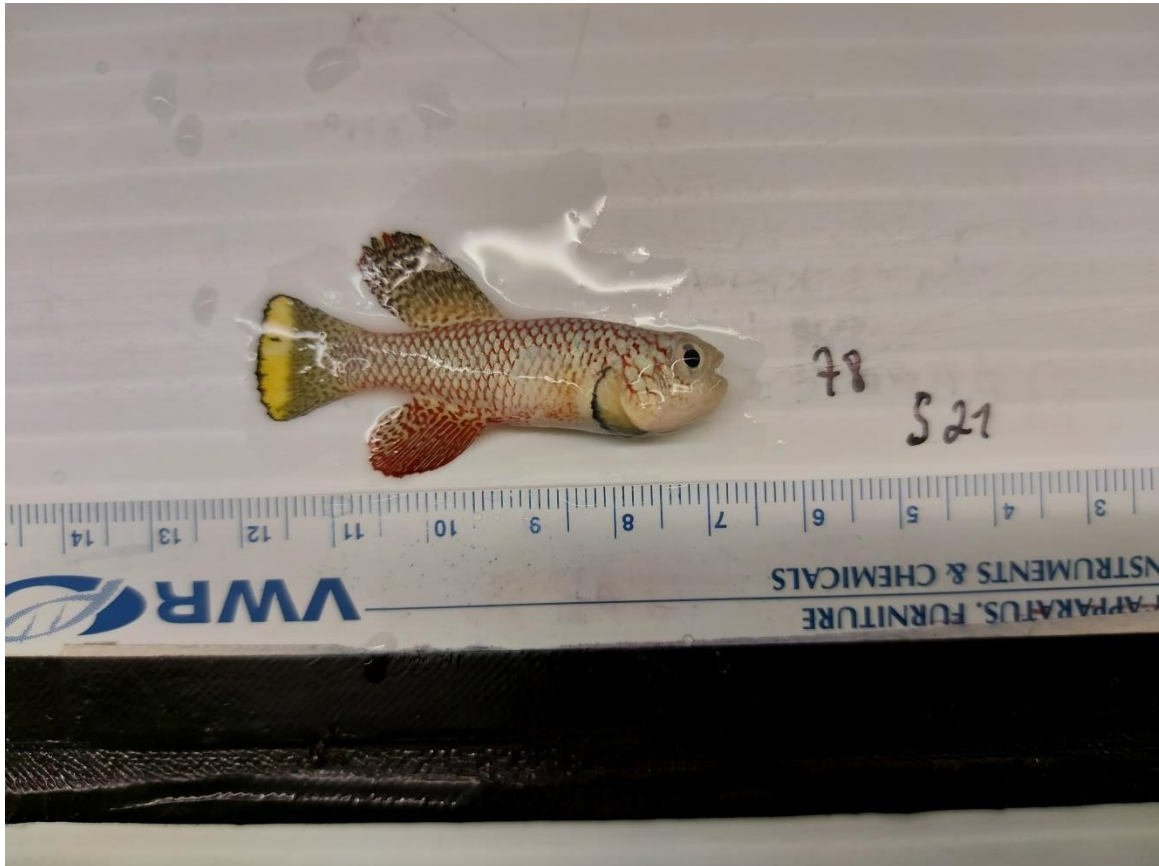


Figure 12 : Photographie de l'individu numéro 78 à l'âge de 21 semaines. Cette photo permet la mesure des différents paramètres morphologiques à posteriori de l'individu.

4) Caractérisation épigénétique du TLR pathway et expression relative des gènes d'intérêts de *Nothobranchius furzeri*

4.1) Cartographie des îlots CpG des gènes d'intérêts

Les zones riches en CpG des 5 gènes du TLR pathway ont été cartographiées à l'aide d'outils bio-informatique. Les séquences génomiques des 5 gènes analysés (TLR2, TLR5, TLR7, TLR9, TOLLIP) sont issus du *Genome Browser* du killifish turquoise créé par le Leibniz Institute on Aging-Fritz Lipmann dInstitute (Reichwald *et al.*, 2015). Les îlots CpG ont été ensuite déterminés par le programme *pyromark* ainsi qu'à l'aide du programme *Methprimer* du site en ligne Urogene.org (Li et Dahiya, 2002). Ce programme a été configuré pour détecter des zones spécifiques riches en CpG : une séquence de plus de 200 paires de bases, un pourcentage de bases G et C de plus de 50 % et un ratio de CpGs observés/attendus de plus de 60% (Yang *et al.*, 2016).

4.2) Extraction d'ADN et d'ARN

Les dissections ont été réalisées sur les 14 poissons testés en comportement et 2 poissons non-testés après la dernière semaine de test. Durant celles-ci, le cerveau a été récupéré en moins de 2 min et le foie + gonades en moins de 5 minutes. Une rapidité de prélèvement est primordiale pour une bonne conservation des tissus biologiques prélevés. Les dissections se sont réalisées sur glace et une fois le prélèvement effectué, les échantillons sont directement plongés dans de l'azote liquide avant d'être conservés dans un congélateur à -80°C.

L'extraction de l'ADN et de l'ARN a été réalisée en utilisant le kit d'extraction *Quick-DNA/RNA Microprep Plus Kit*. La manipulation s'est réalisée selon le protocole d'extraction spécifique aux tissus animaux fourni avec le kit. Après extraction, la concentration d'ADN et de l'ARN est mesurée grâce au *Nanodrop* puis conservé à -20°C.

4.3) Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une méthode qui permet de réaliser un séquençage de l'ADN sans clonage et permet une lecture directe de la séquence obtenue. En vue d'étudier la méthylation de l'ADN, un traitement bisulfite est nécessaire. Lors de ce traitement, les cytosines non méthylées sont transformées en uracile et finalement en thymidine. Grâce à ce procédé, la transformation d'une information épigénétique non analysable en une séquence analysable est possible.

Le traitement bisulfite a été réalisé en suivant le protocole fourni avec le kit de conversion *Zymo EZ-DNA Methyl-Gold* (Zymo Research, Irvine, CA). La conception des amorces a été réalisée grâce au programme *PyroMark Assay Design Software 2.0.2* (Quiagen). Les séquences sont disponibles en **Annexe 1**.

Grâce aux amorces conçues au préalable, une amplification des séquences d'intérêts après le traitement bisulfite a été effectuée en réalisant une PCR avec le kit *PyroMark PCR* (Quiagen). Le protocole contenu dans le kit a été suivi méticuleusement. Le mix PCR a été préparé de la manière suivante pour chaque tube : 12.5 µl de *PyroMark PCR Master Mix*, 2.5 µl de *CoralLoad*, 6 µl d'eau RNase free, 2 µl de primers à concentration 0.1 µM et 2 µl d'ADN traité au bisulfite. Par la suite, une vérification a été réalisée grâce à une migration d'1 µl des amplicons sur gel d'Agarose 2%. Ces amplicons sont ensuite conservés sous -20°C.

Le pyroséquençage a été réalisé sur 15 µl de produit PCR à l'aide du pyroséquençeur *Pyromark Quiagen Q 24* (Quiagen). Les réactifs qui ont été utilisés sont présent dans le kit *PyroMark Q24 Advanced Reagents* (Quiagen). Toutes les manipulations ont été réalisées en suivant le protocole du kit. Le design du séquençage a été effectué grâce au programme lié au pyroséquençeur : *Pyromark Q24 Advanced* (Quiagen). Les séquences complètes avec les positions CpG pour chacun des gènes d'intérêt qui ont été analysées dans le pyroséquençeur sont disponibles en **Annexe 2**.

4.4) qPCR et expression relative des gènes d'intérêt

La PCR quantitative (qPCR) est couramment utilisée lorsqu'on s'intéresse à mesurer une expression relative de gènes. Le principe est le même que celui d'une PCR classique mais en plus de cela un fluoromètre ainsi qu'un colorant fluorescent (SYBR Green) y est ajouté. Le but principal étant de pouvoir suivre en temps réel l'amplification cyclique d'un brin d'ADN. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN présente est mesurée grâce à l'émission du marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. En effet, le marqueur utilisé ne fluoresce que lorsqu'il se fixe à un ADN double brin. La machine permettant la qPCR établit alors un seuil de fluorescence, qui une fois dépassé, donne accès à un cycle seuil (**Ct**). Ces **Ct** sont indispensables pour les calculs d'expression relative de gènes.

En premier lieu, pour permettre l'analyse de l'expression relative des gènes, la création d'ADN complémentaire via une transcriptase inverse est nécessaire. Cette ADNc est alors amplifiée grâce à la qPCR et les résultats obtenus sont les différents **Ct** propres à chaque gène d'intérêts. Cependant, avec les **Ct** seuls, il est impossible de calculer l'expression relative des gènes d'intérêts. En effet, pour calculer l'expression relative de gènes d'intérêts par rapport à un gène de référence, il est nécessaire tout d'abord de calculer l'efficacité des amorces.

Différents couples d'amorces ont été conçus pour TLR2, TLR5, TLR7, TLR9 et TOLLIP grâce au logiciel *Amplifix* car aucune amorce n'avait été créé dans la littérature pour ces gènes chez cette espèce de poisson. Un tableau récapitulatif de l'ensemble des amorces utilisées est disponible en **annexe 3**. Pour obtenir les ADNc nécessaires à la qPCR, le protocole de Dnase

du kit PROMEGA ainsi que le protocole pour la transcription inverse du kit THERMO ont été suivis. Le plan de plaque qui a été utilisé pour tester l'efficacité des amorces est représenté dans le **tableau 2**. Chaque gène d'intérêt est regroupé en fonction du couple d'amorces utilisé. Des triplicats de dilutions en série croissante de l'ADNc (5x,25x,125x,625x,3125x) d'un pool de 16 échantillons ont été effectués pour permettre de créer par la suite des courbes de calibrations propres à chaque couple d'amorces par gène. En théorie, ces dilutions croissantes en série sont censées donner des courbes d'amplification décalées d'un cycle de PCR à chaque fois. L'eau Rnase free ainsi que le pool d'ARN traité à la Dnase dilué 50X (noté RT-) servent quant à eux de contrôles négatifs.

Tableau 2 : Plan de plaque pour tester l'efficacité des couples d'amorce par gène d'intérêt.

Efficacité des Primers																										
Gènes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
TOLLIP C1	A	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TOLLIP C2	B	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TOLLIP C3	C	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 2 C1	D	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 2 C2	E	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 5 C1	F	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 5 C2	G	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 7 C1	H	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 7 C2	I	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 7 C3	J	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 9 C1	K	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TLR 9 C2	L	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
TPB	M	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
B-actine	N	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
GADPH-1	O	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						
eEF1A-1	P	5	5	5	25	25	25	125	125	125	625	625	625	3125	3125	3125	eau	eau	RT-	RT-						

L'efficacité des amorces a pu être calculée grâce à la formule suivante :

$$Efficiency (\%) = \left(10^{\frac{-1}{Slope}} - 1 \right) \times 100$$

Cette formule a nécessité au préalable la création d'une droite de calibration propre à chaque couple d'amorce testé. Pour permettre de réaliser les futurs calculs d'expression relative selon la méthode Pfaffl, les couples ayant une efficacité comprise entre 90 et 110% ont été retenus.

A la suite de cela, Le plan final des plaques a été créé et peut être retrouvé dans le **tableau 3**. À la suite des calculs de l'efficacité des amorces, seulement 4 gènes sur les 5 gènes d'intérêts initiaux ont pu être retenus et deux gènes de références ont dû être écartés. Pour les deux plaques du tableau 3, une double dilution en série est réalisée pour vérifier si l'efficacité de chacun des gènes est toujours comprise entre 90 et 110%. Les échantillons pour les 4 gènes sont disposés en triplicats (1=>16) avec une dilution unique 100X pour chacun d'entre eux.

Tableau 3 : Plan final de la plaque 1 et 2 en vue de la QPCR.

Plaque 1																									
B-actine	Efficiency + Genes																								
TOLLIP C2	Efficiency + Genes																								
TLR 5 C1	Efficiency + Genes																								
eEF1A-1	Efficiency																								
TLR 9 C2	Efficiency																								
TLR 7 C2	Efficiency																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
B		E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8
C		E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16
D		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
E		E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8
F		E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16
G		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
H		E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8
I		E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16
J		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
K		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
L		S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK
M																									
N																									
O																									
P																									

Plaque 2																									
eEF1A-1	Efficiency + Genes																								
TLR 9 C2	Efficiency + Genes																								
TLR 7 C2	Efficiency + Genes																								
B-actine	Efficiency																								
TOLLIP C2	Efficiency																								
TLR 5 C1	Efficiency																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
B	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8	
C	E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16	
D	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
E	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8	
F	E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16	
G	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
H	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	E4	E4	E4	E5	E5	E5	E6	E6	E6	E7	E7	E7	E8	E8	E8	
I	E9	E9	E9	E10	E10	E10	E11	E11	E11	E12	E12	E12	E13	E13	E13	E14	E14	E14	E15	E15	E15	E16	E16	E16	
J	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
K	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
L	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	RT-	RT-	RT-	BLK	BLK	BLK	
M																									
N																									
O																									
P																									

5) Statistiques

Deux analyses portant sur les quatorze poissons survivants ayant été testés depuis la semaine 5 jusqu'à la semaine 21 ont été réalisées à l'aide du programme R studio version 2021.09.1+372 et R version 4.1.2 (R Core Team, 2021). Dans la première analyse, des modèles statistiques ont été créés sur base des données disponibles de la semaine 5 jusqu'en semaine 21 (ne comprenant donc que des variables issues du MIA). Ces modèles ont ensuite été davantage investigués pour trouver un éventuel effet de l'âge sur les variables comportementales d'intérêts.

Dans la seconde analyse, la semaine 21 a été analysée de manière plus approfondie dans le but d'observer l'agressivité des poissons à ce moment-là en fonction de l'ensemble des variables explicatives disponibles, comprenant cette fois-ci la méthylation et l'expression relative. Dans les deux analyses, les choix des variables explicatives et réponses ont été fait grâce à une analyse en composantes principales (ACP) (**annexe 4**).

5.1) ACP sur les variables réponses et explicatives pour les deux analyses

Une analyse en composantes principales a été réalisée sur l'ensemble des variables explicatives et réponses dans le but de ne garder que les variables les plus pertinentes. L'ACP est une méthode d'analyse de données multivariées permettant l'exploration des jeux de données multidimensionnels constitués de variables quantitatives. L'ACP a été exécutée à l'aide de la fonction *dudi.pca* du package *ade4* (Bougeard et Dray, 2018). Les corrélations entre les variables sont évaluées avec le test non paramétrique de Spearman via la fonction *rcorr* du package *Hmisc*. Pour chaque variable, septante observations correspondantes aux quatorze poissons testés à cinq semaines différentes sont positionnées sur les deux axes principaux de l'ACP. Finalement, une charte de corrélation a été réalisée en plus via la fonction *chart.Correlation* du package *PerformanceAnalytics*.

5.2) Première analyse : agressivité en fonction de l'âge

Préalablement, Les conditions d'applications des modèles suivants ont été vérifiées. C'est-à-dire l'indépendance des réponses, l'absence de surdispersion grâce à la fonction *overdisp_fun* du package *PsychHelperFunctions* ainsi que la normalité de la distribution des résidus graphiquement (via la fonction *hist()* ou *plotresid()* dans R). L'ensemble des modèles utilisés lors des analyses statistiques sont présentés en **annexe 5**.

Les variables qui ont été retenues pour permettre d'évaluer l'agressivité sont le nombre de morsures envers le miroir, la latence avant la première morsure ainsi que le temps passé par le poisson dans la zone éloignée (les autres zones étant corrélées n'ont pas été analysées). L'analyse s'est réalisée grâce à des modèles linéaires généralisés mixtes. La variable « mouvements stéréotypés » était de base également un candidat pour évaluer l'agressivité mais a été finalement abandonnée car jugée trop subjective. Une autre variable d'intérêt a également été retenue : la distance parcourue relative. Cette dernière est une variable intéressante car celle-ci permet de n'avoir accès qu'à l'effet de l'âge. En effet, en divisant la distance parcourue par la taille pour chacun des poissons, on évite d'avoir le biais de la corrélation positive taille : âge dans l'analyse.

Pour l'analyse en tant que telle, la fonction *glmer.nb* du package *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2013), utilisant une distribution négative binomiale étant donnée la présence de surdispersion, a été utilisée pour les morsures. La latence avant la première morsure, la zone éloignée ainsi que la

distance parcourue relative ont été analysées via la fonction *lmer* du package *lme4* (Bates et al., 2015). Des transformations ont été nécessaires sur les variables et sont disponibles en annexe 5.

5.2.1) Conception des modèles

Plusieurs variables explicatives peuvent être intégrées dans ces modèles pour permettre d'expliquer au mieux l'évolution de la variable réponse. Ces variables explicatives sont divisées en deux : les facteurs fixes et les facteurs aléatoires. Les facteurs fixes permettent d'expliquer la variable réponse en influençant directement sur sa moyenne tandis que les facteurs aléatoires exerceront une influence sur sa variance (Crawley, 2013).

Dans cette étude, le facteur fixe prépondérant est l'âge. À la suite de l'ACP, des variables explicatives comme la température et la conductivité de l'eau lors du test MIA peuvent être également ajoutés aux modèles en tant que facteur fixe. Pour ne pas avoir le problème de pseudo-réplication temporelle lié à des mesures répétées sur les mêmes individus à un âge différent, l'identité des poissons a été modélisée comme effet aléatoire dans les modèles. Cela permet en réalité de spécifier aux modèles que les données sont dépendantes entre-elles et que toutes les données attribuées au numéro du poisson ont été réalisées sur ce même poisson tout le long de l'expérience.

Une sélection de modèle a été réalisée pour permettre de déterminer quels effets fixes s'adaptent le mieux pour expliquer la variable réponse. Pour cela, une comparaison de modèle se basant sur un calcul de vraisemblance (*AIC*) est réalisée avec la fonction *anova* du programme R. Le modèle avec le plus faible *AIC*, celui qui offre donc la meilleure explication de la variable réponse est retenue en vue d'une analyse future.

Une fois le modèle choisi, la fonction *Anova* du package *car* (Fox et Sanford, 2019) est utilisée pour permettre de tester la significativité de l'effet fixe sur la variable réponse. Cette fonction utilise un test chi carré de Wald entre les différences de variances engendrées par l'ajout ou la disparition d'un effet fixe.

La répétabilité des individus a été calculée en mettant l'identité des poissons en effet aléatoire. Le but étant de quantifier des différences individuelles. Dans un modèle généralisé linéaire mixte, le calcul de la répétabilité est possible dans le cas le plus simple où il existe des

mesures répétées (quantification d'un comportement) sur des mêmes individus. La répétabilité est alors calculée de la manière suivante : $R = Vg / (Vg + Vr)$ avec R = répétabilité, Vg = variance entre moyenne des groupes (entre les mesures faites sur les mêmes individus) et Vr = la somme de la variance résiduelle au niveau du groupe et au niveau des données (non expliquée par les effets fixes et aléatoires). Pour cela, la fonction *rpt* du package *rptR* (Stoffel *et al.*, 2017) est utilisée car elle permet l'accès à une valeur de répétabilité pour le modèle en question.

Lorsque que la significativité d'un facteur est mise en évidence en fonction de l'âge, un test à posteriori est réalisé. Pour les modèles *glmer*, un contraste de dunn est réalisé pour savoir s'il existe des différences de conditions en fonction du modèle. Ce test est réalisé avec la fonction *dunn.test* du package *dunn.test* (Alexis, 2017). Cependant, pour les modèles *lmer*, un contraste avec la fonction *emmeans* du package *emmeans* (Lenth, 2019) est réalisé car plus adapté à des modèles linéaires mixtes.

6.1) Analyse de l'agressivité en S21

Une régression linéaire multiple a été effectuée pour cette analyse tout en vérifiant au préalable les conditions d'applications. Tout d'abord, La normalité des résidus et l'homoscédasticité des résidus a été vérifiée via la fonction *check_model* du package *performance* (Lüdecke D *et al.*, 2021). La linéarité des relations entre la réponse et les variables prédictives est vérifié également via la fonction *scatterplotMatrix* du package *car* (Fox et Sanford, 2019). Concernant la multicolinéarité, c'est la fonction *check_collinearity* du package *performance* (Lüdecke D *et al.*, 2021) qui est utilisée.

Les variables sont choisies en fonction de l'ACP (**annexe 4**) de la même manière que pour la première analyse. Les variables réponses qui ont été retenues sont cette fois le nombre de morsures, la distance parcourue relative, le temps passé dans la zone intermédiaire et dans celle éloignée. De la même manière, les variables explicatives retenues sont : la taille, l'aire de la nageoire caudale (NC), la conductivité, le poids des testicules (PT) l'expression relative de

TOLLIP et TLR5 ainsi que la méthylation des gènes d'intérêts TLR7, TLR2 et la partie promotrice de Tollip.

La conception des modèles comporte moins d'éléments étant donné qu'il n'y a pas d'effet aléatoire. La fonction *glm* du package *stats* a été utilisée pour les modèles établis à partir du nombre de morsures. Pour les autres variables réponses, la fonction *lm* du même package a été utilisée. Ensuite, une comparaison de modèle a été réalisée en se basant sur un calcul de vraisemblance (*AIC*). Le modèle avec le plus faible *AIC*, celui qui offre donc la meilleure explication de la variable réponse est retenue en vue d'une analyse future.

Une fois le modèle choisi, la fonction *Anova* du package *car* (Fox et Sanford, 2019) est utilisée pour permettre de tester la significativité de/des effets fixes sur la variable réponse. Cette fonction utilise un test chi carré de Wald entre les différences de variances engendrées par l'ajout ou la disparition d'un effet fixe.

Résultats

Les résultats ci-dessous présentent les deux analyses statistiques concernant les mesures d'agressivité en fonction de l'âge et celles concernant l'agressivité en semaine 21. Une partie descriptive du niveau de méthylation des différents gènes étudiés est également présentée dans la section 3.

1) Agressivité en fonction de l'âge

1.1) Morsures en fonction de l'âge

Morsures = cette variable représente le nombre de morsures envers le miroir qu'un individu a réalisé durant les 15 min de test MIA.

Le nombre de morsures a été modélisé avec l'âge en effet fixe et l'identité du poisson en effet aléatoire (**annexe 4**). L'effet de l'âge sur le nombre de morsure est significatif avec une p-valeur de 0.03285. Les différentes moyennes de morsures sont respectivement 63,9 pour la semaine 5, 68,5 pour la semaine 9, 108,2 pour la semaine 13, 99,5 pour la semaine 17 et 56,9 pour la semaine 21. Après contraste, il a été mis en évidence que le nombre de morsures en semaine 13 est significativement plus élevée que le nombre de morsures en semaine 5 et 9. De même, le nombre de morsures en semaine 13 et semaine 17 est significativement plus grande que celui en semaine 21. La répétabilité du test est de 0.147 avec une p-valeur de 0.0636. La **figure 13** ci-dessous représente le nombre de morsures en fonction de l'âge.

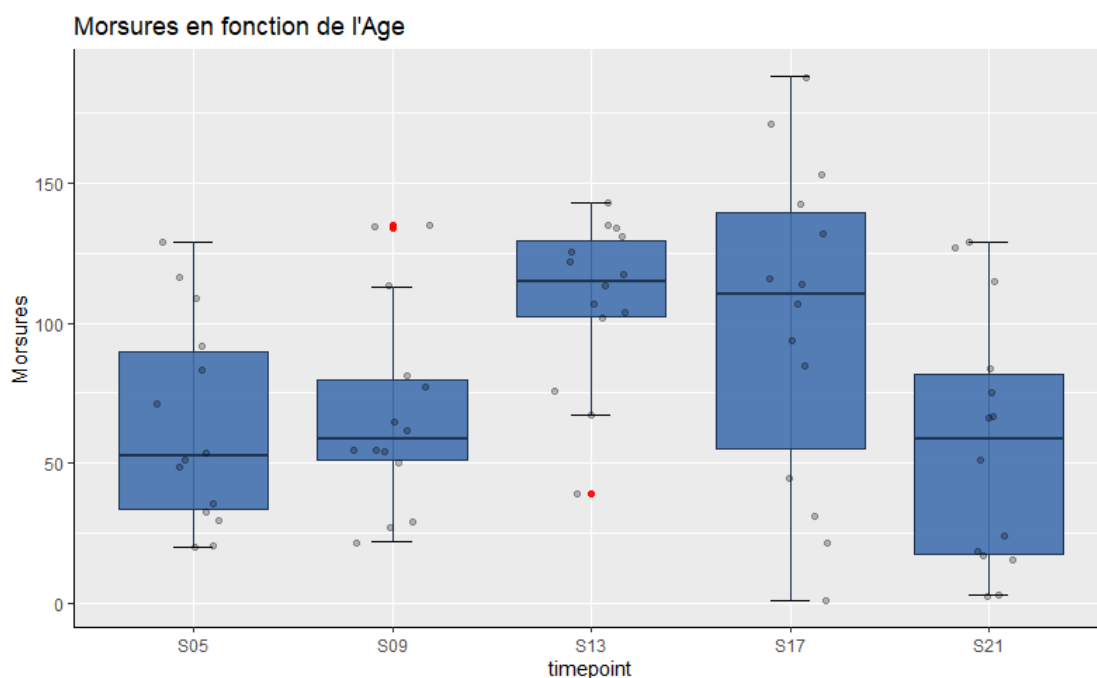


Figure 13 : Nombres de morsures en fonction de l'âge des poissons testés sous MIA

1.2) Latence avant la première morsure en fonction de l'âge

Latence avant la première morsure = cette variable représente le temps écoulé en seconde avant la première morsure envers le miroir.

Cette variable a été modélisée et expliquée par l'âge en effet fixe et l'identité du poisson en effet aléatoire (**annexe 4**). Ce modèle est repris dans le **tableau 4** ci-dessous. Dans ce modèle, l'effet de l'âge sur la latence avant la première morsure n'est pas significatif. Cependant, la p-valeur équivaut à 0.05019, ce qui explique en partie pourquoi des effets de l'âge sont détectés dans le **tableau 4** même si statistiquement ce n'est pas le cas. La répétabilité du test est de 0.019 avec une p-valeur de 0.037. Les différentes mesures de cette variable en fonction de l'âge sont présentées sur la **figure 14** ci-dessous.

Tableau 4 : tableau synthétique du modèle utilisé pour la latence avant la première morsure

LFB			
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	1.48 ***	1.23 – 1.73	58.29
S05	<i>Reference</i>		
S09	0.21	-0.12 – 0.53	52.00
S13	0.22	-0.11 – 0.55	52.00
S17	0.41 *	0.08 – 0.73	52.00
S21	0.44 **	0.11 – 0.77	52.00
Random Effects			
σ^2	0.19		
τ_{00} Fishnumber	0.04		
ICC	0.17		
$N_{\text{Fishnumber}}$	14		
Observations	70		
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.102 / 0.255		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

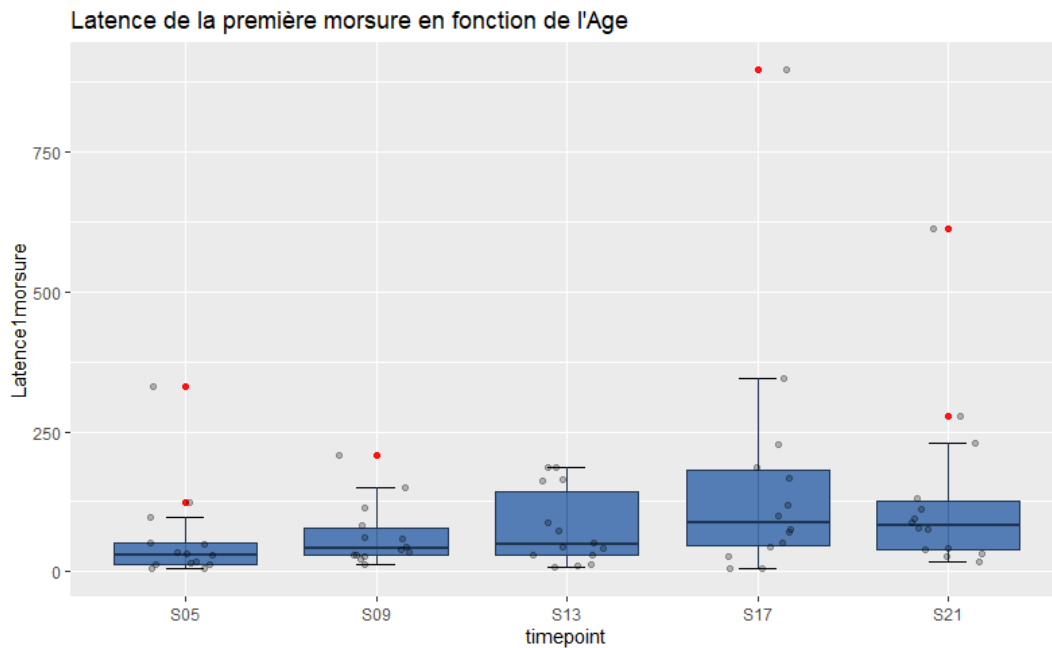


Figure 14 : Latence de la première morsure (en secondes) en fonction de l'âge pour les différents individus testés en comportement.

1.3) Temps passé dans la zone éloignée en fonction de l'âge

En premier lieu, le temps passé en zone éloignée a été modulée en fonction du temps total. C'est-à-dire que c'est ici une proportion du temps passé en zone éloignée qui est analysé vis-à-vis du temps total ($PZeloign = Zeloign / (Zproche + Zinterm + Zeloign + Zrefuge)$). Le temps passé en secondes dans la zone éloignée a été modélisée avec l'âge, la température et la salinité en effets fixes et l'identité du poisson en effet aléatoire (**annexe 4**). Le récapitulatif du modèle se trouve dans le **tableau 5** ci-dessous. L'effet de la température n'est pas significatif, celui de la conductivité est significatif (p-valeur de 0.02804) et l'effet de l'âge n'est pas significatif. La répétabilité a pu être évaluée et a une valeur de 0.26 avec une p-valeur de 0.00437. **La figure 15** représente le temps passés dans la zone éloignée par les individus testés en fonction de leur âge.

Tableau 5 : tableau synthétique du modèle utilisé pour la zone éloignée

<i>Predictors</i>	PZeloign		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.25 ***	0.16 – 0.34	74.26
Temp	0.09	-0.00 – 0.18	71.83
S05	<i>Reference</i>		
S09	0.16	-0.05 – 0.36	70.22
S13	-0.04	-0.14 – 0.06	64.17
S17	0.00	-0.14 – 0.14	68.08
S21	-0.02	-0.12 – 0.09	64.93
Random Effects			
σ^2	0.01		
τ_{00} Fishnumber	0.00		
ICC	0.24		
$N_{Fishnumber}$	14		
Observations	70		
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.154 / 0.355		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

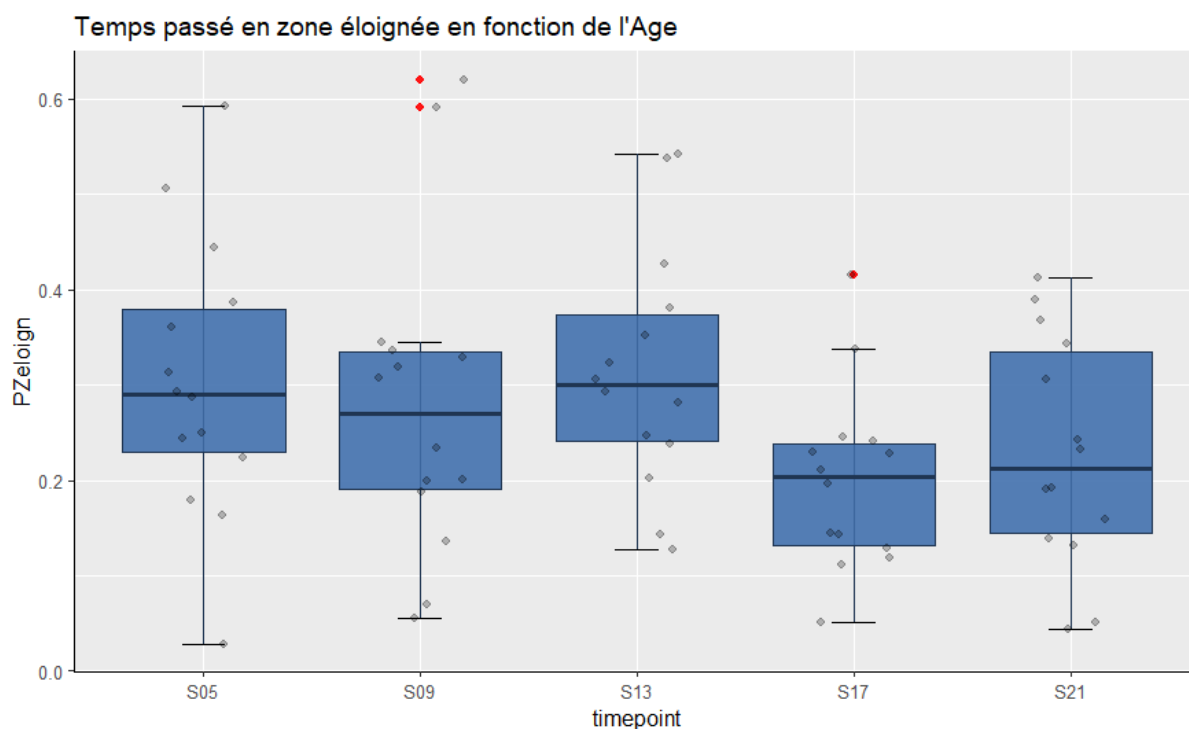


Figure 15 : Temps passé (proportion) dans la zone éloignée en fonction de l'âge pour les différents individus testés en comportement.

1.4) Distance parcourue en fonction de l'âge

La distance parcourue relative a été modélisée avec l'âge en effet fixe et l'identité du poisson en effet aléatoire (**annexe 4**). Le récapitulatif du modèle se trouve dans le **tableau 6** ci-dessous. L'effet de l'âge est significatif avec une p-valeur de 6.441e-09. Après contrastes, la distance parcourue relative est significativement plus grande pour la semaine 13 comparé aux autres semaines comme représenté en **figure 16**. La répétabilité a pu être évaluée et sa valeur est de 0.339 avec une p-valeur de 0.000412.

Tableau 6 : tableau synthétique du modèle utilisé pour la distance parcourue relative

<i>Predictors</i>	RTDM		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	74.07 ***	56.94 – 91.20	44.53
S05	<i>Reference</i>		
S09	12.16	-7.45 – 31.77	52.00
S13	45.80 ***	26.19 – 65.41	52.00
S17	3.35	-16.26 – 22.96	52.00
S21	-15.98	-35.60 – 3.63	52.00
Random Effects			
σ^2	668.74		
τ_{00} Fishnumber	343.01		
ICC	0.34		
N Fishnumber	14		
Observations	70		
Marginal R ² / Conditional R ²	0.296 / 0.535		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

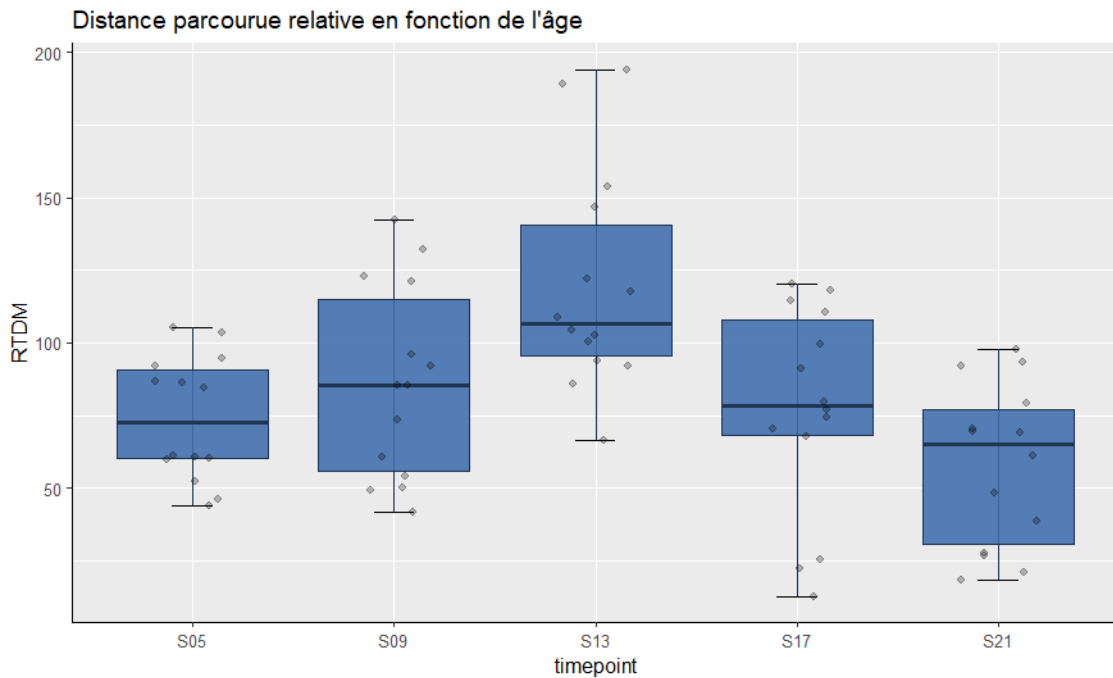


Figure 16 : Distance parcourue relative en fonction de l'âge pour les différents individus testés en comportement.

2) Agressivité en S21

2.1) Morsures chez les poissons âgés de 21 semaines

Le nombre de morsures a été modélisé avec l'aire de la nageoire caudale, la conductivité, le poids des testicules, l'expression relative du gène Tollip, la méthylation du gène TLR7, TLR2 ainsi que celle de la partie promotrice de Tollip (**annexe 4**). Toutes ces variables explicatives sauf TOLLIPexp ont un effet significatif sur le nombre de morsures en semaine 21 comme représenté dans le **tableau 7 ci-dessous**.

Tableau 7 : Anova du modèle associé au nombre de morsure en semaine 21

Analysis of Deviance Table (Type II tests)

Response: Bite

	LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
NC	86.514	1	< 2.2e-16	***	
Sal	36.479	1	1.543e-09	***	
PT	59.829	1	1.035e-14	***	
TOLLIPexp	1.089	1	0.296688		
TLR7Meth	23.439	1	1.289e-06	***	
TLR2Meth	241.357	1	< 2.2e-16	***	
TollipPMeth	6.652	1	0.009902	**	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '.' 0.1 ' ' 1

2.2) Temps passé dans la zone intermédiaire chez les poissons âgés de 21 semaines

Le temps passé dans la zone intermédiaire a été modélisé avec l'aire de la nageoire caudale, la conductivité, le poids des testicules, la taille, l'expression relative du gène Tollip, l'expression relative du gène TLR5 ainsi que la méthylation de TLR7 (**annexe 4**). Il apparaît que la taille, la conductivité, l'expression relative de TLR5 et Tollip semblent avoir un effet sur le temps passé en zone intermédiaire en semaine 21 comme représenté dans le **tableau 8 ci-dessous**.

Tableau 8 : Anova du modèle associé au temps passé en zone intermédiaire en semaine 21

Anova Table (Type II tests)

Response: PZinterm

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
NC	0.00095	1	0.0739	0.811177	
Sal	1.07351	1	83.5582	0.011757	*
PT	0.00560	1	0.4360	0.576922	
Taille	1.81391	1	141.1875	0.007008	**
TOLLIPexp	0.60745	1	47.2813	0.020502	*
TLR5exp	2.58946	1	201.5540	0.004925	**
TLR7Meth	0.19115	1	14.8785	0.061115	.
Residuals	0.02569	2			

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

2.3) Temps passé dans la zone éloignée et la distance parcourue relative chez les poissons âgés de 21 semaines

Les modèles liés à ces variables réponses n'ont donné aucun effet significatif en semaine 21.

Ceux-ci sont disponibles en **annexe 4**.

3) Pourcentage de méthylation en fonction des gènes d'intérêts

5.1) TLR2

Dans le cadre de ce mémoire, un intron riche en CpG du gène TLR2 a été analysé et 7 sites CpG ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. Pour l'ensemble des individus, la moyenne de méthylation est de 71,03 %, ce qui représente une méthylation assez élevée (**Fig 17**). Dix sites devaient être analysés à la base mais certains ont dû être rejetés par suite d'une incertitude d'interprétation des mesures du pyroséquenceur.

5.2) TLR5

Un intron riche en CpG du gène TLR5 a été analysé et 5 sites CpG ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. Pour l'ensemble des

individus, la moyenne de méthylation est de 89,85%, ce qui représente une hyperméthylation **(Fig 17)**.

5.3) TLR7

Un intron riche en CpG du gène TLR7 a été analysé et 7 sites CpG ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. Pour l'ensemble des individus, la moyenne de méthylation est de 91,67%, ce qui représente une hyperméthylation **(Fig 17)**.

5.4) TLR9

Le promoteur riche en CpG du gène TLR9 a été analysé et 6 sites CpG ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. Pour l'ensemble des individus, la moyenne de méthylation est de 81.81%, ce qui représente également une hyperméthylation **(Fig 17)**.

5.5) TOLLIP

Dans le cadre de ce mémoire, un intron riche en CpG du gène Tollip a été analysé et 7 sites CpG ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. Pour l'ensemble des individus, la moyenne de méthylation est de 85,96%, ce qui représente une hyperméthylation **(Fig 17)**. De plus, Le promoteur riche en CpG du gène Tollip a également été analysé et 8 sites CpG sur les 9 ont pu être analysés efficacement pour l'ensemble des individus testés en comportements. La moyenne de méthylation est de 2,83%, ce qui représente une hypométhylation **(Fig 17)**.

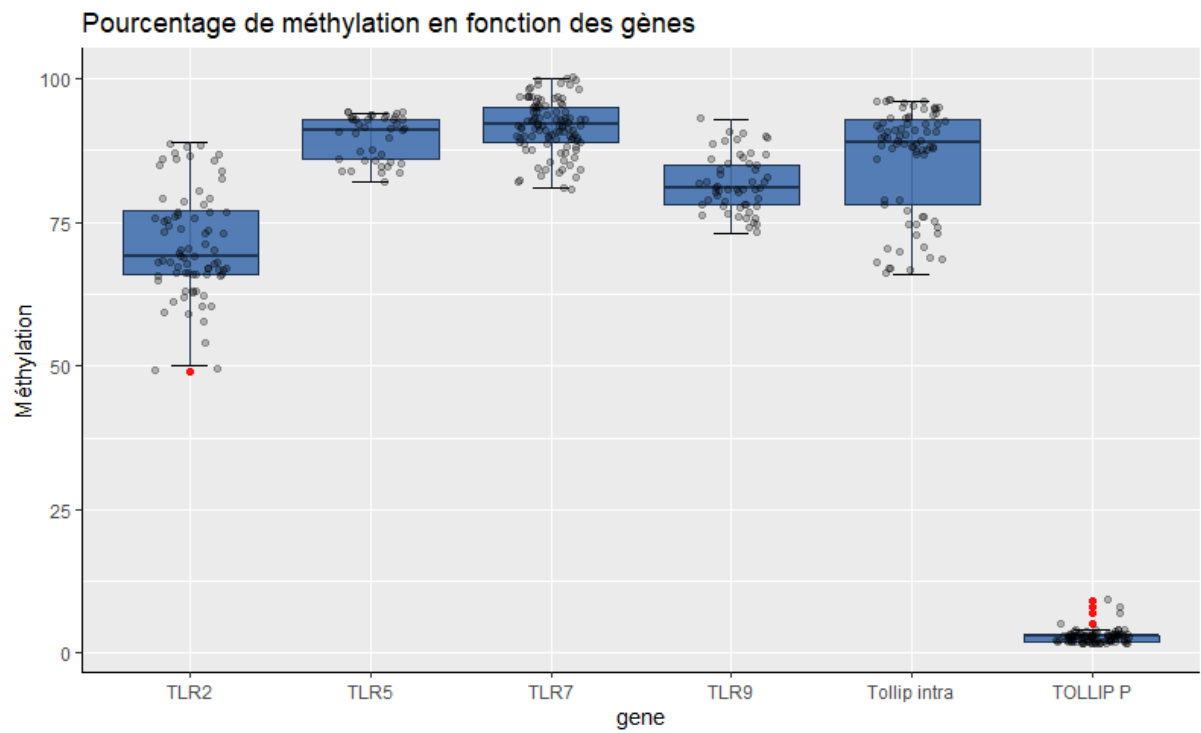


Figure 17 : Pourcentage de méthylation en fonction des différents gènes d'intérêts des 14 individus testés en comportement

Discussion

La courte durée de vie du *Nothobranchius furzeri* en fait une espèce idéale pour étudier et comprendre le vieillissement. Cette étude a pour but d'établir un référentiel concernant l'agressivité de ce poisson en fonction de l'âge ainsi qu'une évaluation du taux de méthylation/expression du TLR pathway à un stade âgé. Un référentiel phénotypique a été établi par l'étude répétée de 14 individus mâles à cinq stades de vie différents (wph 5,9,13,17,21). Ce référentiel comporte des variables comportementales concernant l'agressivité ainsi que des variables morphologiques. Le référentiel épigénétique a été établi sur les 14 individus mâles âgés de 21 semaines post-éclosion(wph) ayant été testés en comportement. Ce référentiel comporte les valeurs de méthylations de bases nucléotidiques CpG de 5 gènes du TLR pathway potentiellement impliqué dans le processus de vieillissement. Concernant le référentiel génétique, seulement 2 des 5 gènes candidats ont pu être analysés quant à leur expression relative pour les 14 individus mâles âgés de 21 semaines. Seul l'objectif spécifique d'agressivité en fonction de l'âge a pu être atteint lors de la réalisation de ce mémoire. Le nombre de poissons disponibles initialement n'a pas permis d'étudier l'évolution des gènes du TLR pathway au cours du vieillissement autant du point de vue de la méthylation que du point de vue de l'expression.

1) Taux de survie du *Nothobranchius furzeri*

En 2003, l'article de Valdesalici et Cellerino a défini l'espérance de vie maximale de la souche GRZ comme étant de 12 semaines (Valdesalici et Cellerino, 2003). Cette publication est une 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 14 individus sur les 20 poissons testés initialement ont vécu au moins vingt-et-une semaine. Cette différence de vie moyenne pourrait indiquer une augmentation de l'espérance de vie de la souche GRZ en laboratoire entre 2003 et 2020. Les individus de la souche GRZ descendent tous de la même population prélevée dans les années 70. Pour cette lignée, la force de sélection principale de leur environnement d'origine a disparu dès la deuxième génération élevée en laboratoire. De plus, les conditions stables de vie en laboratoire associées avec un brassage génétique très faible augmentent le taux d'homozygotie de la souche au fil des

générations (Platzer et Englert, 2016). Une sélection artificielle due à ce nouvel environnement a pu se réaliser sur les individus vivants plus longtemps, ce qui pourrait être une piste pour expliquer l'augmentation de l'espérance de vie entre 2003 et 2020. Cette sélection peut être expliquée en considérant, comme expliqué plus tôt dans l'introduction, le vieillissement comme le résultat de compromis énergétiques (Kirkwood *et al.*, 1991 ; Lemaître *et al.*, 2015). En milieu naturel, les individus avec le meilleur fitness par rapport à leur environnement maximisent leurs chances d'assurer leur descendance (Cellerino *et al.*, 2016). L'allocation d'énergie en milieu naturel dédié à la reproduction est en général élevée laissant ainsi moins d'énergie pour la maintenance et cela a pour conséquence un développement rapide du vieillissement. (Kirkwood *et al.*, 1991 ; Lemaître *et al.*, 2015). En laboratoire, l'énergie dépensée pour la reproduction, la recherche de nourriture ou bien la compétition est en général quasi nulle. Comme conséquence, une énergie plus faible serait investie dans la reproduction car la pression de sélection serait moins forte. De cela découlerait plus d'énergie investie dans la maintenance, retardant ainsi le vieillissement chez *Nothobranchius furzeri*.

Une autre hypothèse d'influence sur le ralentissement du vieillissement résiderait dans la différence de design entre ce mémoire et celui de l'article de Valdesalici et Cellerino. Dans leur étude, les individus étudiés vivent en communauté dans un bassin tandis que lors de la réalisation de ce mémoire, les individus ont vécu dans des bassins individuels dès maturité sexuelle (5 semaines). Cela pourrait expliquer en partie la différence entre les deux espérances de vie. Les mâles n'ont donc aucunes interactions avec leur congénères et un apport constant en nourriture, ce qui n'est jamais le cas en milieu naturel. De plus, l'agression entre mâles, comportement fréquent dans l'environnement naturel de ce poisson, n'est plus possible due à leur isolement (Reichard *et al.*, 2009). Dès lors, plus d'énergie pourrait être allouée dans la maintenance et donc cela retarderait le vieillissement. Peut-être qu'une étude de l'influence sociale de ces poissons sur le vieillissement pourrait être intéressante.

2) Test d'agressivité MIA

L'étude du comportement agressif a été rendu possible grâce au design expérimental et grâce au test MIA réalisé sur les 14 individus mâles jusqu'en semaine 21. Le test MIA a déjà été utilisé notamment pour de nombreuses espèces de poissons tel que le poisson-zèbre (*Danio rerio*), l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), l'espèce *Brycon amazonicus*, l'espèce *Pelvicachromis pulcher* ou encore le poisson de combat siamois *Betta splendens* (Norton et Gutiérrez, 2019 ; Norton *et al.*, 2011 ; Ramos *et al.*, 2021 ; Scherer *et al.*, 2016 ; Serra *et al.*, 2017). Ce test peut être utilisé pour mesurer l'agressivité car il a été reconnu que l'image reflétée dans le miroir est interprétée comme celle d'un congénère ou d'un rival pour le poisson (Balzarini *et al.*, 2014). Cependant, il existe des différences dans les réponses hormonales et génomique lorsqu'un poisson combat un vrai adversaire ou sa propre image dans un miroir. Etant une image dans un miroir, les poissons testés ne connaissent pas de victoire ou de défaite sur leur opposant, ce qui peut dès lors influencer les réponses hormonales ou génomique (Teles et Oliveira, 2016 ; Balzarini *et al.*, 2014). Du point de vue du bien-être animal, des combats entre poissons n'ont pas été réalisés. Dans le cadre de ce mémoire, le design de l'arène a été adapté par la création de zones ainsi qu'en disposant le miroir le long d'un des côtés sans aucune inclinaison. Une étude récente a montré que finalement les poissons pouvaient être plus stressés par l'image dans le miroir que par un individu réel (Hubená, Horký, et Slavík 2021). Le stress plus élevé pouvant alors s'expliquer par une frustration du poisson due au comportement non-naturel de son image dans le miroir (Elwood *et al.*, 2014). Cependant, les combats entre individus entraînent également un lot de stress et même parfois des blessures pour les poissons. Dès lors l'utilisation du MIA fait sens tant du point de vue du stress que du point de vue du bien-être animal.

3) Analyse de l'agressivité avec l'âge

Jusqu'à aujourd'hui, la recherche a permis de découvrir la gliose, la réduction de la neurogenèse ainsi que la neurodégénérescence chez *Nothobranchius furzeri* comme signe de vieillissement commun avec les mammifères (Valenzano *et al.*, 2006 ; Tozzini *et al.*, 2012). La neurodégénérescence est un terme souvent repris car également attribuée à la neuro-inflammation elle-même liée aux TLRs (Okun *et al.*, 2011 ; Mattson et Arumugam, 2018). En effet, il est désormais accepté que les TLR ont une implication dans le processus de

vieillesse et plus particulièrement dans la neuro-inflammation. En réalité, il existe un croisement des mécanismes moléculaire de la senescence cellulaire ainsi que de l'induction de l'inflammation par l'activation de certaines voies de signalisation comme celle de TLR/NF- κ B et bien d'autres (Moskalev *et al.*, 2020). De sorte que désormais le terme « inflamm-aging » est communément utilisé (Franceschi *et al.*, 2000). Des chercheurs ont su prouver un changement d'expression des TLR avec l'âge chez les macrophages en réponse à un pathogène (Liang *et al.*, 2009). Ce changement pourrait rejoindre une autre hypothèse qui est celle des endotoxines. Celle-ci stipule que les endotoxines seraient la cause ou auraient une contribution importante dans la neurodégénérescence (Brown, 2019). En réalité, Les TLR jouent un rôle de médiateurs pour la neuro-inflammation. En réponse à un pathogène, les astrocytes et la microglie entraînent une surexpression des cytokines pro-inflammatoires ainsi que de la voie TLR4/ NF- κ B. Cette neuro-inflammation et ultimement la neurodégénérescence liée peut être réduite en utilisant un inhibiteur de TLR4 (Zhang *et al.*, 2018).

Récemment, la neuro-inflammation a été prouvé comme étant un facteur clé interagissant avec des corrélats neurobiologiques du trouble de dépression majeure comme l'appauvrissement de la sérotonine cérébrale ou encore le dérèglement de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénaline (HPA) (Troubat *et al.*, 2021). La sérotonine est, comme vu dans la partie introductive, impliquée dans de nombreux comportements notamment dans l'agressivité (Dierick et Greenspan, 2007). Une déficience en sérotonine a été prouvée chez des individus plus agressifs ainsi que chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Zarros *et al.*, 2005). De plus, une augmentation de l'agressivité est généralement associée aux maladies neurodégénératives comme Alzheimer (Davies *et al.*, 2018). Dans le même ordre d'idée, un article récent a été publiée en 2017 sur l'influence de la consommation de boissons sucrées sur le comportement agressif. Cert article mets en valeur par une analyse transcriptomique que la consommation à long terme de boissons sucrées dérégulerait les voies transcriptionnelles des réponses inflammatoires dans le cerveau. Cette étude démontre même que la consommation à long terme de boissons sucrées depuis l'enfance jusqu'à l'âge adulte favoriserait le développement d'un comportement agressif modulé par une dérégulation des réponses inflammatoires dans le cerveau (Choi *et al.*, 2017). Ces réponses inflammatoires sont elles-mêmes régulées par les TLR. Il serait donc très intéressant de voir si le vieillissement pourrait avoir le même effet en effectuant une analyse du même type.

Dans ce mémoire, L'effet significatif de l'âge a été prouvé de manière statistique pour le nombre de morsures. La réduction du nombre de morsures observé en semaine 21 laisse supposer une diminution de l'agressivité. Il a été prouvé chez *Nothobranchius furzeri* une altération liée à l'âge de l'ARNm des gènes liés à la sérotonine. Ces modifications liées à l'âge ont de nombreuses similitudes avec celles présentées chez l'homme ou les rats (Evsukova *et al.*, 2021). Il est désormais prouvé que Les TLR sont des régulateurs de la fonction du cerveau et, par conséquent, des changements synaptiques et comportementaux inadaptés en plus de l'activation de la microglie et des réponses inflammatoires, (Liu, Wu, et Li 2019). Le vieillissement et le changement d'expression des TLR avec l'âge pourrait influencer ultimement l'expression des gènes liés à la sérotonine. Les TLR pouvant entraîner une neuro-inflammation qui peut à son tour entraîner un appauvrissement de la sérotonine et influencer le comportement. Peut-être que la diminution de l'agressivité en semaine 21 serait liée à un changement du comportement lié au vieillissement et aux TLR. Cependant rien ne nous permet de l'affirmer dans le cadre de ce mémoire. Il serait intéressant dans une étude future de s'attarder sur les TLR, le vieillissement ainsi que la sérotonine.

Dans la thèse d'Alessandra Carion, une diminution de l'agressivité a été observée avec l'âge chez *Kryptolebias marmoratus* (Carion, 2020). Cela pourrait correspondre à la diminution observée en semaine 21 chez *Nothobranchius furzeri*. Cependant, cette augmentation d'agressivité par le biais des morsures à deux stades jeunes S13 et S17 puis la diminution en S21 est assez particulière et n'a pas été décrite dans la littérature. Il est plus probable que cela soit liée au faible nombre d'individus testés et à la variabilité inter-individuelle discutée ultérieurement.

Concernant la latence avant la première morsure ainsi que le temps passé en zone éloignée, rien de spécialement intéressant ressort des analyses mis à part l'effet de la conductivité sur la zone éloignée. Ce qui n'est pas vraiment explicable étant donné que cette variable était censée être contrôlée et que celle-ci ne peut en aucun cas expliquer la présence du poisson ou non dans la zone éloignée (ou alors cela voudrait dire que la conductivité n'est pas similaire en tout point de l'arène de test). L'existence d'une diminution de la salinité en semaine 9 doit exercer une influence dans l'analyse et donc être détecté comme un effet potentiel.

4) Distance parcourue relative avec l'âge

Grâce à l'analyse effectuée sur la distance parcourue relative en fonction de l'âge, il a été possible de mettre en évidence que les individus testés sous MIA ont parcouru plus de distance en semaine 13 que durant les autres semaines. La **figure 16** montre une certaine tendance d'augmentation progressive de la distance parcourue jusqu'en semaine 13 suivie d'une diminution progressive jusqu'en semaine 21. Cette augmentation de la distance parcourue de la semaine 5 à la semaine 13 serait expliqué par le passage du stade juvénile au stade adulte. Le développement des muscles lors du passage d'un stade à l'autre entraînerait alors une amélioration des capacités à nager (Heid, 2018). Ce qui est intéressant dans cette étude c'est de voir la diminution de la distance parcourue jusqu'en semaine 21. La comparaison avec le nombre de morsures pourrait être pertinente malgré le fait que le nombre de morsure en s17 est encore assez élevé. Une diminution de la locomotion chez les *Nothobranchius furzeri* âgés a déjà été démontré à de nombreuses reprises (Genade *et al.*, 2005 ; Valenzano *et al.*, 2006 ; Reichard *et al.*, 2009 ; Heid, 2018). En réalité ce n'est pas propre à cette espèce car il y a une baisse des performances physiques liées à l'âge chez de nombreuses autres espèces dont l'homme (Baker et Tang, 2010 ; Gilbert *et al.*, 2014 ; Arnold *et al.*, 2017 ; Hamezah *et al.*, 2017). Chez l'homme vieillissant tout comme chez le poisson zèbre ou encore ici le *Nothobranchius furzeri*, la diminution des capacités physiques est en partie attribuée à la sarcopénie et donc à la perte de masse et de force associée (Lushaj *et al.*, 2008 ; Terzibasi *et al.*, 2008 ; Gilbert *et al.*, 2014). La structure anormale des muscles associés à la sarcopénie serait la cause d'une fréquence accrue de courbure de la colonne vertébrale chez le poisson-zèbre âgé (Gerhard et Cheng, 2002). Cela est sans doute le cas aussi pour le killifish turquoise étant donné que cette courbure de la colonne vertébrale est aussi observée aux stades âgés (Terzibasi *et al.*, 2008). En plus de tout cela, en vieillissant, la dépense énergétique pour se déplacer est de plus en plus importante. Cela amène les individus à moins se mouvoir (Ortega et Farley, 2015).

Une explication qui pourrait rejoindre la tendance observée avec le nombre de morsure serait que les poissons âgés ont moins d'énergie à dépenser pour effectuer des mouvements tels que les morsures ou le déplacement. Dans les grandes caractéristiques du vieillissement, on retrouve les dysfonctions mitochondriales, la sénescence cellulaire ou encore l'altération de la communication intercellulaire (López-Otín *et al.*, 2013). Ces processus, qui impactent

l'organisme entièrement, engendreraient une allocation d'énergie plus importante dans le maintien des individus âgés plutôt que dans la dépense d'énergie pour des morsures ou un déplacement.

5) Agressivité et variabilité inter-individuelle

Dans le cadre de cette étude, il a été possible de remarquer une diversité dans les réponses des individus au fil du temps. Les répétabilités calculées pour chacune des variables d'intérêts se situent entre 0-30% sauf pour la distance parcourue relative. Cela signifie que les mesures prises entre chaque individu ne représentent que 0-30% de la variance totale du test. Les estimations de répétabilité obtenues ne sont pas assez importantes que pour affirmer la présence d'une individualité, celle-ci nécessitant une répétabilité de 30% (Bierbach *et al.*, 2017 ; Schuster *et al.*, 2017). Cependant, c'est le cas pour la distance parcourue relative. Dans le cas de cette analyse en fonction de l'âge, les poissons sont différents les uns des autres par rapport aux réplicas (âge) du même poisson. Pour les autres variables, le faible nombre d'individus disponible a influencé la qualité de l'analyse et donc le rejet de l'individualité n'est pas forcément représentatif de la réalité. Mais il est tout de même important que dans ce mémoire, il existe une individualité pour la distance parcourue relative mais pas pour le nombre de morsures ou la latence avant la première morsure. Dès lors, ces deux composantes de l'agressivité analysées ici ne permettent pas d'affirmer que l'agressivité est un trait de personnalité.

Toutefois, comme l'agressivité est un trait de personnalité, il devrait être cohérent dans le temps (Stamp et Groothuis, 2010). Or ce qui est observé dans les résultats est une variation de l'agressivité en fonction de l'âge. En prenant l'exemple du poisson 59, celui-ci voit son nombre de morsures augmenter de manière régulière jusqu'à avoir une diminution assez importante en semaine 21. Certains poissons tendaient à faire plus de morsures que d'autres à certains moments de leur vie mais cela changeait radicalement d'une semaine à l'autre montrant que dans le cadre de cette expérience et sur ces 14 poissons, l'agressivité n'est pas continue dans le temps. C'est pourquoi en général les études comportementales nécessitent un grand nombre d'individu pour limiter au maximum la variabilité inter-individuelle.

Toutefois, il serait également possible que ce comportement agressif représente un comportement artefact. Il a été prouvé que le contact social était important au

développement d'un trait de personnalité (Bierbach *et al.*, 2017, Freund *et al.*, 2013a). Pour le poisson-zèbre par exemple, l'environnement social peut avoir un impact sur la variance phénotypique de l'agressivité (Moore *et al.*, 1997 ; Wolf *et al.*, 1998 ; 1999 ; Wilson *et al.*, 2009 ; McGlothlin *et al.*, 2010). Cependant, *Nothobranchius furzeri* n'est pas une espèce vivant en banc et il a été prouvé que les poissons solitaires présentaient des niveaux d'agressivité plus élevés que les poissons élevés en groupes sociaux (Thoré *et al.*, 2020).

L'habituation pourrait également expliquer le manque de continuité dans l'agressivité chez les individus testés. L'habituation au cours du temps est généralement associée à une diminution de la réponse comportementale à la suite de la reconnaissance des stimuli procurés par le test (Winandy et Denoël, 2013). Cependant, l'habituation peut également être soumise à des variations entre individus de sorte que certains individus n'apprennent pas de la même manière et donc, avec une différence du taux d'habituation entre individus (Bell et Peeke, 2012). Cela expliquerait donc pourquoi on observe une diminution du nombre de morsures chez certains individus en semaine 21 alors qu'il augmente pour d'autres. Il existe aussi la possibilité d'une interaction entre habituation et effet du vieillissement sur ce poisson, ce qui traduirait un certain apprentissage.

De plus, la variabilité inter-individuelle comportementale pourrait être vue comme un des mécanismes originels à l'existence de l'écologie comportementale expliquant le comportement animal d'un point de vue évolutif et fonctionnel. Dans ce cas, la variabilité observée durant ce test comportemental d'agressivité pourrait être vue comme de la plasticité comportementale, mécanisme permettant de s'adapter au mieux à des variations environnementales (Thoré *et al.*, 2018).

En somme, La variabilité inter-individuelle combiné avec une certaine habituation pour certains individus est une hypothèse pour expliquer ces différences dans le nombre de morsures traduisant une différence d'agressivité de ces poissons lors de leur vieillissement.

6) Analyse de l'agressivité en S21

Les analyses effectuées sur les 10 individus en semaine 21 ont permis de détecter des effets pour le nombre de morsures ainsi que pour le temps passé en zone intermédiaire. Tout d'abord, il a été trouvé que, le niveau de méthylation des gènes TLR2, 7 ainsi que la partie promotrice de Tollip ont un effet significatif sur le nombre de morsures observé en semaine 21. Dans la littérature, une étude sur des souris knock-out TLR2 a prouvé que cela induisait un comportement schizophrénique chez ces mêmes souris avec notamment des troubles cognitifs, des comportements anxiogènes ou encore un retrait social (Park *et al.*, 2015). Chez les poissons étudiés lors de cette analyse, il est possible qu'une expression plus faible du gène TLR2 entraînerait un comportement anxiogène et donc un nombre de morsures moins élevées. Cependant, rien ne permet d'affirmer cela et il manque des données pour les semaines précédentes. Concernant TLR7, sa suppression entraîne une réduction de l'agressivité et de l'anxiété encore une fois chez les souris (Hung *et al.*, 2018). Encore une fois, sans données de comparaison avec les autres semaines de test, il n'est pas possible d'affirmer quoique ce soit. Pour ce qui concerne Tollip, la seule littérature scientifique qui mentionne un lien avec l'agressivité et le comportement est la thèse d'Alessandra Carion (2020).

L'aire de la nageoire caudale ainsi que le poids des testicules peut cependant avoir un impact sur l'agressivité même si cela n'est pas prouvable dans le cadre de ce mémoire. L'étude de Alward *et al.*, a démontré que la taille influençait la notion de dominance chez les poissons territoriaux de sorte que les mâles plus gros soit plus susceptible d'être les mâles dominants. Dans cet article, les individus de l'espèce étudiée (*Astatotilapia burtoni*) qui sont qualifiés de mâles dominants ont comme caractéristiques une grande taille, des couleurs plus prononcées ainsi que de testicules plus lourdes que les autres mâles (Alward *et al.*, 2021). Ce qui pourrait donc expliquer l'effet significatif de l'aire de la nageoire caudale ainsi que le poids des testicules dans cette analyse en S21. Cependant, les données brutes ne vont pas dans ce sens. En analysant celles-ci, il apparaît que les individus ayant effectué le plus de morsures en semaine 21 n'ont pas les valeurs les plus élevées pour le poids des testicules ainsi que pour l'aire de la nageoire caudale.

Pour le temps passé dans la zone intermédiaire, les effets significatifs sont la taille, la conductivité, l'expression relative de Tollip ainsi que celle de TLR5. L'effet de la conductivité

de l'expression de Tollip ainsi que TLR5 n'a pas vraiment de sens dans cette analyse. Il est peu probable qu'il existe un quelconque effet réel de ces variables sur le temps passé dans la zone intermédiaire. En ce qui concerne la taille en revanche, il est possible que celle-ci ait influencé le temps passé en zone intermédiaire. Grâce aux données brutes, il est possible d'observer qu'effectivement, la proportion du temps passé en zone intermédiaire est plus élevée chez les poissons de plus grande taille. Il est effectivement intéressant d'observer que les poissons mesurant plus de 5 cm en semaine 21 passe plus de temps en zone intermédiaire plutôt qu'en zone proche. Un lien peut également être établi avec le fait que ces mêmes poissons réalisent moins de morsures que les autres. Cela irait donc dans l'idée que chez les poissons grands et vieux sont encore moins agressifs que les autres poissons du même âge chez *Nothobranchius furzeri*. Cependant, il est impossible de prouver cela dans cette analyse, mais une étude plus approfondie allant dans ce sens pourrait potentiellement être intéressante.

Cette analyse a été réalisée sur un échantillon de petite taille. Il est fort probable que dans ce cas-ci les effets significatifs soient en réalité des variables qui ont été captées comme associées à la variable réponse étudiée mais pas comme causale à celle-ci. Et cela est notamment d'autant plus probable que l'échantillon est petit.

7) Caractérisation épigénétique

La méthylation de cinq gènes a été analysée sur le cerveau de 14 individus mâles âgés de 21 semaines. Ces séquences géniques sont des parties riches en CpG de deux promoteurs, et de quatre introns. Les promoteurs ont été choisis car leur méthylation peut influencer directement les taux d'expressions géniques, ce qui peut influencer l'expression d'un phénotype (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 (Jones, 2012). Ces séquences ont été étudiées sur 5 gènes : Tollip, TLR2, TLR5, TLR7, TLR9.

6.1) TLR2

TLR 2 serait accompagné d'un changement de signalisation avec le vieillissement (Bailey *et al.*, 2019). Son rôle est connu entre autres dans la reconnaissance des composants chez la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* et dans l'induction de signaux pro-inflammatoires (Underhill *et al.*, 1999). Une hyperméthylation a été retrouvée chez TLR2 notamment en présence de la bactérie *Fasciola gigantica* chez le buffle menant à une répression de la transcription de TLR2 (Mei *et al.*, 2019). Dans ce mémoire, une hyperméthylation a été observée chez les individus âgés de 21 semaines. Cela rejoindrait l'idée qu'il y aurait un changement de signalisation avec l'âge car moins de récepteur de type TLR2 présent entraînant ainsi une cascade de réaction menant potentiellement à une neurodégénérescence (Bailey *et al.*, 2019). Mais rien ne permet d'affirmer cela étant donné que l'on ne connaît pas le taux de méthylation de ce gène à un stade plus jeune pour les *Nothobranchius furzeri* testés. De plus la partie analysée est sans doute différente de celle utilisée dans les autres recherches associées à la méthylation de TLR2.

6.2) TLR5

Le TLR5 est connu pour sa capacité à reconnaître les protéines des flagelles bactériennes (Olivieri *et al.*, 2013). L'hyperméthylation observée dans ce mémoire indiquerait une répression de transcription de TLR5 chez les *Nothobranchius furzeri* âgés de 21 semaines. Mais dans la plupart des études, TLR5 est associé à une augmentation de son expression liée avec l'âge (Mark *et al.*, 2012 ; Qian *et al.*, 2012). Il a même été prouvé récemment que la sur expression de TLR5 jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Herrera-Rivero *et al.*, 2019). Une étude sur la méthylation de TLR5 a prouvé que la méthylation du second site CpG du promoteur du gène TLR5 entraînait une diminution de l'expression de celui-ci affectant la résistance de porcelets à *E. coli*F18 (Chao-Hui *et al.*, 2018). Le résultat observé dans ce mémoire va à l'encontre des résultats obtenus dans la littérature concernant l'expression de TLR5 avec l'âge, ce qui laisse supposer que les résultats obtenus dans cette étude sont différents de la réalité ou alors différents chez *Nothobranchius furzeri*. Encore une fois, un effet réel ne peut être mis en valeur car il n'y a pas de données disponibles à un stade plus jeune.

6.3) TLR7-TLR9

Ces gènes sont réunis car leurs endosomes respectifs peuvent reconnaître les molécules d'acides nucléiques viraux (Takeuchi et Akira, 2009). Cependant, ils ont également leur spécificité. TLR7 a été identifié dans l'implication de la neurodégénération liée à la maladie d'Alzheimer (Lehmann *et al.*, 2012). TLR9 quant à lui, voit son expression significativement augmenter dans les muscles squelettiques de souris âgées (Lyu *et al.*, 2019). Une étude a trouvé que certains sites CpG spécifiques du promoteur de TLR9 sont hyperméthylés dans des régions du cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer comparés à des cerveaux de personnes saines (Sun et Li, 2018). Le même phénomène est observé dans ce mémoire même si aucun point de comparaison n'est possible.

Comme discuté plus tôt, l'inflamm-aging et l'immunosénescence sont des signes du vieillissement. Il apparaît que les cellules dendritiques joueraient un rôle central dans l'inflamm-aging humain (Gupta et Agrawal, 2013). Justement, il a été trouvé que TLR7 et TLR9 se retrouvaient sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) qui sont des capteurs innés qui produisent de l'IFN- α en réponse aux infections virales. Avec le vieillissement, il a été prouvé qu'à la fois les réponses de TLR7 et TLR9 étaient altérées (Stout-Delgado *et al.*, 2008). Plus spécifiquement, les pDCs voient leur stimulation via TLR7 réduite comparé aux jeunes adultes (Splunter *et al.*, 2019).

L'hyperméthylation observée durant ce mémoire sur les individus testés pourrait indiquer une répression de la transcription de TLR7 et TLR9. Ce résultat pourrait avoir une implication dans le cas d'une neurodégénérescence dû à l'âge ou un inflammaging, ayant pour conséquence une altération du niveau d'expression de ces deux gènes. Cependant, des données plus complètes sont nécessaires à ce sujet.

6.4) TOLLIP (toll interacting-protein)

Tollip est une protéine exprimée partout et conservée chez les vertébrés (homme, souris, rat, poisson zèbre, *Xenopus*) et les vers (TLI-1 chez *Caenorhabditis elegans*). Cette protéine sert de molécule adaptatrice dans la voie de signalisation des récepteurs Toll-like (Bulut *et al.*, 2001).

Une étude en lien avec le vieillissement a pu déterminer qu'une déficience en Tollip pouvait accélérer la mort des neurones liée à des maladies neurologiques telles que la maladie

d'Alzheimer (Chen *et al.*, 2017). Selon la thèse d'Alessandra Carion, il y a une différence entre les individus non-agressifs ayant une méthylation de la partie promotrice du gène Tollip de 13,93% contre 55,22% chez les individus agressifs (Carion, 2020). Dans ce mémoire, on observe une hypométhylation de la partie promotrice de Tollip associé à une diminution de l'agressivité en semaine 21. Le manque de données de comparaison à un stade plus jeune et l'impossibilité de créer un système avec des individus agressifs vs non-agressifs ne permet pas de conclure quoique ce soit. Par rapport à nos données, la partie intragénique est hyperméthylée. Concernant cette hyperméthylation, cela pourrait aller dans le même sens que l'article de Chen *et al.*, avec une déficience de Tollip due à l'hyperméthylation de la zone intragénique. Cependant, aucune cause à effet ne peut être émise dans le cadre de ce mémoire. Une étude plus détaillée de la méthylation totale de l'ensemble des gènes analysées sur plusieurs stades de vie chez le killifish turquoise pourrait être très informative quant à une possible régulation épigénétique du vieillissement cérébral du poisson lié à l'immunosénescence, l'inflamm-aging et à la neurodégénérescence.

Finalement, il serait intéressant à l'avenir de creuser plus en détail les analyses des gènes TLR tout en les mettant en lien avec l'agressivité étant donné que de plus en plus d'évidence suggère une relation entre agressivité et système immunitaire (Wang *et al.*, 2018). Quelques études ont démontré une corrélation positive entre des cytokines pro-inflammatoires et les traits agressifs provenant de troubles psychiatriques (Coccaro *et al.*, 2015 ; Mommersteeg *et al.*, 2008). L'agressivité tend à être modulé par la réponse immunitaire chez le rivulus des mangroves tout comme chez l'homme (Carion, 2020). Comme cela a été discuté dans la section 3 en ce qui concerne les liens entre comportement agressif, TLR et vieillissement, il est probable d'observer la même chose chez *Nothobranchius furzeri* mais le peu de données disponibles ne permet pas de l'affirmer.

Conclusion

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

Premièrement, un référentiel phénotypique reprend les résultats du test d'agressivité MIA réalisée sur plusieurs individus à cinq stades de leur vie ainsi que les mesures morphologiques associées à ces poissons en fin d'expérience. Le référentiel d'agressivité permet de souligner une variabilité inter-individuelle élevée dans la réponse au test réalisé. Une variabilité des réponses pour le nombre de morsures et la distance parcourue relative a également été établie entre les différents stades de vie étudiés. La différence pour le nombre de morsures est traduite par une augmentation du nombre de morsures en semaine 13 et 17 puis une diminution de celui-ci à l'âge le plus avancé. Pour la distance parcourue relative, une augmentation graduelle a été relevée jusqu'en semaine 13 puis une diminution. L'analyse de la mortalité des individus a permis de suggérer une augmentation notable de l'espérance de vie de la souche GZR en laboratoire à l'heure actuelle.

Finalement, un référentiel de méthylation et d'expression relative de séquences géniques a été établi chez les poissons âgés de 21 semaines. Cinq séquences géniques différentes du TLR pathway ont pu être caractérisées et peuvent être étudiées à l'avenir sur des stades de vie moins avancés de cette espèce. Des effets de la partie promotrice de Tollip, TLR2 ainsi que TLR7 ont été captés sur le nombre de morsures en semaine 21. C'est pourquoi une future recherche sur l'effet des TLR sur le comportement agressif des individus âgés de l'espèce *Nothobranchius furzeri* est une piste prometteuse pour élucider le vieillissement du système immunitaire, l'inflamm-aging et leurs influences sur l'agressivité.

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 agressif de *Nothobranchius furzeri*. Un plus grand nombre de poisson à tester pourrait être intéressant pour approfondir le sujet de sorte à pouvoir en prélever assez à chaque stade en vue des analyses statistiques et biomoléculaires. De plus, ces individus pourraient être analysés directement en pyroséquençage et en qPCR, ce qui permettrait de lier phénotype, méthylation et expression relative. Une future étude sur une diminution du nombre de morsures à un âge avancé tout en liant cela à une analyse de la méthylation des gènes du TLR pourrait aboutir à des conclusions intéressantes. De même qu'une étude visant à étudier l'effet des TLR sur la sérotonine tout au long du vieillissement. Vis-à-vis des méthylations analysées, une étude supplémentaire sur des âges moins 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.

Bibliographie :

Aamidor, S.E., Yagound, B., Ronai, I. et 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. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0670>

Ackermann, M., Stearns, SC., Jenal U (2003) Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science*. 300 (5627):1920. <https://doi-org/10.1126/science.1083532>

Aiello, A., Farzaneh F., Candore G., Caruso C., Davinelli S., Gambino C. M., Ligotti M. E., Zareian N., et Accardi G. (2019) « Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention ». *Frontiers in Immunology* 10 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247>

Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4(7):499–511. <https://doi-org/10.1038/nri1391>

Akira, S., Uematsu S., et Takeuchi O. (2006) « Pathogen Recognition and Innate Immunity ». *Cell* 124 (4): 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

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., A. Nowak M. (2017) Evolutionary dynamics on any population structure. *Nature* 544: 227–230. Nature Publishing Group. <https://doi-org/10.1038/nature21723>

Alward, Beau A., Phillip H. Cathers, Danielle M. Blakkan, Andrew P. Hoadley, et Russell D. Fernald. 2021. « A Behavioral Logic Underlying Aggression in an African Cichlid Fish ». *Ethology* 127 (7): 572-81. <https://doi.org/10.1111/eth.13164>.

Amor, S., Puentes F., Baker D., et Van Der Valk P. (2010) « Inflammation in Neurodegenerative Diseases ». *Immunology* 129 (2): 154-69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>

Anderson, K.V., Jurgens, G., Nusslein-Volhard, C., (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779–789. [https://doi-org/10.1016/0092-8674\(85\)90274-0](https://doi-org/10.1016/0092-8674(85)90274-0)

Ang, T.Z., Manica, A., (2010) Benefits and Costs of Dominance in the Angelfish *Centropyge bicolor*. *Ethology* 116, 855–865. <https://doi.org/10.1111/j.1439P0310.2010.01798.x>

Angers, B., Castonguay, E. et Massicotte, R., (2010) Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 19(7), pp.1283–1295. <https://doi-org/10.1111/j.1365-294x.2010.04580.x>

Arents, G. et Moudrianakis, E.N., (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), pp.11170–4. <https://doi-org/10.1073/pnas.92.24.11170>

Ariyomo, Tolulope O., Carter M., et Watt. P. J. (2013) « Heritability of Boldness and Aggressiveness in the Zebrafish ». *Behavior Genetics* 43 (2): 161-67. <https://doi.org/10.1007/s10519-013-9585-y>.

Ariyomo, Tolulope O., et Watt P. J. (2012) « The Effect of Variation in Boldness and Aggressiveness on the Reproductive Success of Zebrafish ». *Animal Behaviour* 83 (1): 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.10.004>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188538>

Austad, S. N. (1997) *Why We Age* (Wiley, New York).

Azam, S., Jakaria Md., Kim I-S., Kim J., Haque Md. E., et Choi D-K. (2019) « Regulation of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Pathway by Polyphenols in the Treatment of Age-Linked Neurodegenerative Diseases : Focus on TLR4 Signaling ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01000>

Bailey, Kristina L., Lynette M. Smith, Art J. Heires, Dawn M. Katafiasz, Debra J. Romberger, et Tricia D. LeVan. (2019) « Aging Leads to Dysfunctional Innate Immune Responses to TLR2 and TLR4 Agonists ». *Aging Clinical and Experimental Research* 31 (9): 1185-93. <https://doi.org/10.1007/s40520-018-1064-0>

Balzarini, V., Taborsky, M., Wanner, S., Koch, F., et G. Frommen J. 2014. « Mirror, Mirror on the Wall: The Predictive Value of Mirror Tests for Measuring Aggression in Fish ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68 (5): 871-78. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1698-7>.

Barton, Gregory M., et Jonathan C. Kagan. (2009) « A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization ». *Nature reviews. Immunology* 9 (8): 535-42. <https://doi.org/10.1038/nri2587>

- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." *Journal of Statistical Software*, **67**(1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Batrinou, Menelaos L. (2012) « Testosterone and Aggressive Behavior in Man ». *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 10 (3): 563-68. <https://doi.org/10.5812/ijem.3661>
- Batut, B., Parsons, DP, Fischer, S. *et al.*,. (2013) Évolution in silico expérimentale : un outil pour tester des scénarios évolutifs. *BMC Bioinformatics* 14, S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S15-S11>
- Baumgart, M., Groth, M., Priebe, S., Testa, G., Dix, A., Ripa, R., ... Goethe-universit, K. D. J. W. (2014). RNA-seq of the aging brain in the short-lived fish *N. furzeri* - conserved pathways and novel genes associated with neurogenesis. *Aging Cell*, 13, 965–974. <https://doi.org/10.1111/acer.12257>
- Baumgart, M., Di Cicco, E., Rossi, G., Cellerino, A. et Terzibas Tozzini, E. (2015). Comparison of captive lifespan, age-associated liver neoplasias and age-dependent gene expression between two annual fish species: *Nothobranchius furzeri* and *Nothobranchius korthausae*. *Biogerontology* 6, 63–69. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9535-y>
- Bell, A.M., (2005) Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Evol. Biol.* 18, 464–473. <https://doi.org/10.1111/j.1420P9101.2004.00817.x>
- Bell, A.M., Stamps, J.A., (2004) Development of behavioural differences between individuals and populations of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Anim. Behav.* 68, 1339–1348. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.007>
- Bell, A. M., et Sih. A. (2007) « Exposure to Predation Generates Personality in Threespined Sticklebacks (*Gasterosteus Aculeatus*) ». *Ecology Letters* 10 (9): 828-34. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01081.x>
- Bell, Christopher G., Lowe R., Peter D. Adams, Andrea A. Baccarelli, Beck S., Jordana T. Bell, Brock C. Christensen, *et al.*,. (2019) « DNA Methylation Aging Clocks: Challenges and Recommendations ». *Genome Biology* 20 (1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>
- Bell, A.M., Peeke, H.V.S., (2012) Individual variation in habituation: behaviour over time toward different stimuli in threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). <https://doi.org/10.1163/1568539XP00003019>
- Bender, J. (2004) Dna Methylation and Epigenetics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 41–68 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141641>

- Bhattacharyya S, Varga J. (2018) Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: implications for systemic sclerosis and its targeted therapy. *Immunol Lett* 195:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.09.011>
- Bierbach, D., Laskowski, K.L., Wolf, M., (2017) Behavioural individuality in clonal fish arises despite near-identical rearing conditions. *Nat. Commun.* 8, 15361. <https://doi.org/10.1038/ncomms15361>
- Bird, Adrian. (2002) « DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory ». *Genes et Development* 16 (1): 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Blažek, R., Poláčik, M., Kačer P., Cellerino A., Řežucha R., Methling C., Tomášek O., *et al.*, (2017) « Repeated Intraspecific Divergence in Life Span and Aging of African Annual Fishes along an Aridity Gradient ». *Evolution* 71 (2): 386-402. <https://doi.org/10.1111/evo.13127>.
- Blažek,R., Poláčik,M. et Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4, 24. <https://doi-org/10.1186/2041-9139-4-24>
- Bougeard S, Dray S (2018). “Supervised Multiblock Analysis in R with the ade4 Package.” *Journal of Statistical Software*, 86(1), 1–17. doi: 10.18637/jss.v086.i01
- Bowles, J.T. (1998) « The Evolution of Aging: A New Approach to an Old Problem of Biology ». *Medical Hypotheses* 51 (3): 179-221. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90079-2](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90079-2)
- Brown, Culum, Burgess, F., Braithwaite, V. a., (2007) Heritable and experiential effects on boldness in a tropical poeciliid. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 237–243. <https://doi.org/10.1007/s00265P007P0458P3>
- Brown, G. C. (2019). The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* 161, 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1564-7>
- Brubaker, Sky W., Kevin S. Bonham, Zanoni I., et Jonathan C. Kagan. (2015) « Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective ». *Annual Review of Immunology* 33: 257-90. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Buck, S., Vettraino, J., Force, A. G. et Arking, R. (2000) Extended longevity in *Drosophila* is consistently associated with a decrease in larval viability. *J. Gerontol. A* 55, B292–B301. <https://doi.org/10.1093/gerona/55.6.b292>
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., Arditi, M., (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* 167, 987–994. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.987>

Burns, J.G., (2008) The validity of three tests of temperament in guppies (*Poecilia reticulata*). J.Comp. Psychol. 122, 344–356. <https://doi.org/10.1037/0735P7036.122.4.344>

Cadenas, E., et K. J. Davies. (2000) « Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging ». Free Radical Biology et Medicine 29 (3-4): 222-30. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)

Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A. et Fraga, M.F. (2009) The role of epigenetics in aging and age-related diseases. Ageing Res. Rev. 8: 268–276. <https://doi-org/10.1016/j.arr.2009.03.004>

Camougrand, N. et 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. [https://doi-org/10.1016/s0034-5687\(01\)00314-0](https://doi-org/10.1016/s0034-5687(01)00314-0)

Campisi J, (2013) Campisi J: Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol. 2013; 75:685 705. <https://doi-org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>

Campos, C., Valente, L.M.P., Fernandes, J.M.O., (2012) Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. Gene 500, 93–100. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2012.03.041>

Caramaschi, D., de Boer, S. F. et Koolhaas J. M. (2008) « Is Hyper-Aggressiveness Associated with Physiological Hypoarousal? A Comparative Study on Mouse Lines Selected for High and Low Aggressiveness ». Physiology et Behavior 95 (4): 591-98. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.019>.

Careau V, Thomas D, Pelletier F, Turki L, Landry F, Garant D, Réale D (2011) Genetic correlation between resting metabolic rate and exploratory behaviour in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). J Evol Biol 24(10):2153–2163 <https://doi-org/10.1111/j.1420-9101.2011.02344.x>

Carion, A. (2020) Characterization of the brain molecular bases of personalities and assessment of their developmental plasticity in response to environmental stressors using an emerging model fish species, the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology.

Cellerino, A., Valenzano, D.R. et 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. <https://doi-org/10.1111/brv.12183>

Chang, Ching, Cheng-Yu Li, Ryan L. Earley, et Yuying Hsu. (2012) « Aggression and Related Behavioral Traits: The Impact of Winning and Losing and the Role of Hormones ». *Integrative and Comparative Biology* 52 (6): 801-13. <https://doi.org/10.1093/icb/ics057>

Charlesworth, B. (1994) *Evolution in Age-Structured Populations* (Cambridge Univ. Press, Cambridge).

Chao-Hui, D., F. Hai-Yue, Z. Qiu-Fang, W. U. Sheng-Long, et B. Wen-Bin. 2018. « Relationship between methylation in promoter region of TLR5 gene and resistance to *Escherichia coli* F18 of Sutaï weaned piglets. » *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 49 (5): 897-906. <https://doi.org/10.11843/j.issn.0366-6964.2018.05.004>

Chen, Keqiang, Ruoxi Yuan, Shuo Geng, Yao Zhang, Taojing Ran, Elizabeth Kowalski, Jingze Liu, et Liwu Li. 2017. « Toll-Interacting Protein Deficiency Promotes Neurodegeneration via Impeding Autophagy Completion in High-Fat Diet-Fed ApoE^{-/-} Mouse Model ». *Brain, Behavior, and Immunity* 59 (janvier): 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.002>.

Choi, J-Y, Park M-N, Kim C-S, Lee Y-K, Choi E J, Chun W J, et Shin D-M. (2017) « Long-Term Consumption of Sugar-Sweetened Beverage during the Growth Period Promotes Social Aggression in Adult Mice with Proinflammatory Responses in the Brain ». *Scientific Reports* 7 (1): 45693. <https://doi.org/10.1038/srep45693>.

Christman, J.K., (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNAmethylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699>

Coccaro, Emil F., Lee, R. et Coussons-Read M. (2015) « Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokines and Aggression in Personality Disordered Subjects ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (7): pyv001. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv001>.

Conrad, J. L., K. L. Weinersmith, T. Brodin, J. B. Saltz, et A. Sih. (2011) « Behavioural Syndromes in Fishes: A Review with Implications for Ecology and Fisheries Management ». *Journal of Fish Biology* 78 (2): 395-435. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02874.x>

Cooper, W. E. et Vitt, L. J. (1987) Deferred agonistic behaviour in a long-lived scincid lizard *Eumeces laticeps*: field and laboratory data on the roles of body size and residence in agonistic strategy. *Oecologia*, 72, 321e326. <https://doi-org/10.1007/bf00377558>

Corsi, P. (2001) *Lamarck, genèse et enjeux du transformisme, 1770-1830*. CNRS ÉDITIONS, Paris. <https://doi.org/10.4000/histoire-cnrs.405>

Costa, W. J. E. M. (2018). Comparative morphology, phylogeny and classification of African seasonal killifishes of the tribe Nothobranchiini (Cyprinodontiformes : Aplocheilidae). Zoological Journal of the Linnean Society, (February), 1–21. <https://doi.org/10.1093/zoolinlean/zlx102/4857373>

Courtene-Jones, W., Briffa, M. (2014) Boldness and asymmetric contests: Role and outcome dependent effects of fighting in hermit crabs. Behav. Ecol. 25, 1073–1082. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru085>

Crawley, Michael J. (2013) The R book, 2e. A John Wiley et Sons, Ltd., Publication. Chapter 19, pp 681-684

D'Amore, D.M., RiosPCardenas, O., Morris, M.R., (2015) Maternal investment influences development of behavioural syndrome in swordtail fish, *Xiphophorus multilineatus*. Anim. Behav. 103, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.02.013>

Dahlbom SJ, Lagman D, Lundstedt-Enkel K, Sundström FL, Winberg S (2011) Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*). PLoS One 6:e23565 <https://doi-org/10.1371/journal.pone.0023565>

Darwin C (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London

Davidson, R. J., Putnam, K. M., and Larson, C. L. (2000). Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. Science 289, 591–594. doi: 10.1126/science.289.5479.591 <https://doi-org/10.1126/science.289.5479.591>

Davies, S. J., M. Burhan A., Kim D., Gerretsen P., Graff-Guerrero A., L. Woo V., Kumar S., Colman S., G Pollock B., H Mulsan B., K Rajji T., (2018) « Sequential Drug Treatment Algorithm for Agitation and Aggression in Alzheimer's and Mixed Dementia ». Journal of Psychopharmacology (Oxford, England) 32 (5): 509-23. <https://doi.org/10.1177/0269881117744996>.

Deans, C., Maggert, K.A., (2015) What do you mean, "epigenetic"? Genetics 199, 887–896. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.114.173492>

Deaton, A.M. et Bird, A., (2011) CpG islands and the regulation of transcription. Genes et development, 25(10), pp.1010–22. <https://doi-org/10.1101/gad.2037511>

Diane E. H., Castro R., et Loscalzo J. (2011) « Epigenetic Modifications ». Circulation 123 (19): 2145-56. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>

Dickerson, Sally S., et Margaret E. Kemeny. (2004) « Acute Stressors and Cortisol Responses: A Theoretical Integration and Synthesis of Laboratory Research ». *Psychological Bulletin* 130 (3): 355-91. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.3.355>

Dierick HA, Greenspan RJ. (2007) Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nat Genet.* ; 39 (5) : 678 - 682 . <https://doi.org/10.1038/ng2029>

Dingemans, N.J., Wright, J., Kazem, A.J.N., Thomas, D.K., Hickling, R., Dawnay, N., (2007) Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *J. Anim. Ecol.* 76, 1128–1138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01284.x>

Dorn, A., Ng'oma, E., Janko, K., Reichwald, K., Polačik, M., Platzer, M., Reichard, M. (2011). Phylogeny, genetic variability and colour polymorphism of an emerging animal model: The short-lived annual *Nothobranchius* fishes from southern Mozambique. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.010>

Douglas J. Futuyma (2013). *Evolution*. Troisième édition. Massachusetts USA : Sinauer Associates, Inc., 656.

Drent, Pieter J., Van Oers, K., et Van Noordwijk. A. J. (2003) « Realized Heritability of Personalities in the Great Tit (*Parus Major*) ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270 (1510): 45-51. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2168>

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11(3):362–71.

Du, X., Han, L., Guo, A. P. Y., Zhao, Z., (2012) Features of methylation and gene expression in the promoter associated CpG Islands using human methylome data. *Comp. Funct. Genomics* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/598987>

Earley, R.L., Hsu, Y., Wolf, L.L., (2000) The use of standard aggression testing methods to predict combat behaviour and contest outcome in *Rivulus marmoratus* dyads "(Teleostei: Cyprinodontidae). *Ethology* 106, 743–761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00586.x>

Ellison, A., de Leaniz, C.G., Consuegra, S., (2013) Inbred and furious: negative association between aggression and genetic diversity in highly inbred fish. *Mol. Ecol.* 22, 2292–300. <https://doi.org/10.1111/mec.12238>

Elwood, R. W., Stoilova, V., McDonnell, A., Earley, R. L., & Arnott, G. (2014). Do mirrors reflect reality in agonistic encounters? A test of mutual cooperation in displays. *Animal Behaviour*, 97, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.07.028>

Evsukova, V. S., Kulikova E. A., et Kulikov A. V. (2021) « Age-Related Alterations in the Behavior and Serotonin-Related Gene mRNA Levels in the Brain of Males and Females of Short-Lived Turquoise Killifish (Nothobranchius Furzeri) ». *Biomolecules* 11 (10): 1421. <https://doi.org/10.3390/biom11101421>.

Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*, 4th end. Longmans Green, Harlow, Essex, UK

Fernald, Russell D. (2003) « How Does Behavior Change the Brain? Multiple Methods to Answer Old Questions ». *Integrative and Comparative Biology* 43 (6): 771-79. <https://doi.org/10.1093/icb/43.6.771>

Filby AL, Paull GC, Hickmore TFA, Tyler CR (2010) Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11:498 <https://doi-org/10.1186/1471-2164-11-498>

Fischle, W., Wang, Y., David, A.C., (2003) Histone and chromatin crosstalk. *Curr.Opin.Cell Biol.*15,172–183. [https://doi.org/10.1016/S0955P0674\(03\)00013P9](https://doi.org/10.1016/S0955P0674(03)00013P9)

Foret, S., Kucharski, K., Pittelkow, Y., Lockett, G.A., Maleszka, R., (2009) Epigenetic regulation of the honeybee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics* 10. <https://doi-org/10.1186/1471-2164-10-472>

Fox, J. et Sanford, W. (2019) *An {R} Companion to Applied Regression*, Third Edit (Sage, ed). Thousand Oaks CA.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, *et al.*,. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>

Franceschi, C., Garagnani P., Vitale G., Capri M., et Salvioli S. (2017) « Inflammaging and “Garb-Aging” ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 28 (3): 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.005>

Freund, J., Brandmaier, A.M., Lewejohann, L., Kirste, I., Kritzler, M., Krüger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., Kempermann, G., (2013) Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science* (80P). 340, 756–759. <https://doi.org/10.1126/science.1235294>

Fulop, T., et R Montgomery R. (2014) « Immune Senescence: Known Knowns And Unknown Unknowns ». *Current opinion in immunology* 29 (août): vii-ix. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.06.005>

Fülöp, T., Herbein G., Cossarizza A., Jacek M. Witkowski, Frost E., Dupuis G., Pawelec G., et Larbi A. (2017) « Cellular Senescence, Immunosenescence and HIV ». *Interdisciplinary Topics in Gerontology and Geriatrics* 42: 28-46. <https://doi.org/10.1159/000448542>

Furness, A., Tatarenkov, A., Avise, J.C., 2015. A genetic test for whether pairs of hermaphrodites can cross fertilize in a selfing killifish. *J. Hered.* 106, 749–752. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv077>

Fuso A, Ferraguti G, Grandoni F, Ruggeri R, Scarpa S, Strom R, *et al.*,. (2010) Early demethylation of non-CpG, CpC-rich, elements in the myogenin 5'-flanking region: a priming effect on the spreading of active demethylation. *Cell Cycle.*;9:3965–76. <https://doi-org/10.4161/cc.9.19.13193>

Fuso A, Ferraguti G, Scarpa S, Ferrer I, Lucarelli M. (2015) Disclosing bias in bisulfite assay: MethPrimers underestimate high DNA methylation. *PLoS One.*10:e0118318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118318>

Fuso A, et Lucarelli M. (2019) « CpG and Non-CpG Methylation in the Diet–Epigenetics–Neurodegeneration Connection ». *Current Nutrition Reports* 8 (2): 74-82. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0266-1>

Genade, T., Benedetti, M., Terzibas, E., Roncaglia, P., Valenzano, D. R., Cattaneo, A., et Cellerino, A. (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell*, 4(5), 223–233. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00165.x>

Gerhard G.S., K.C. Cheng (2002) A call to fins! Zebrafish as a gerontological model *Aging Cell*, 1 (2) pp. 104-111 <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00012.x>

Ghosh, Amiya K., O'Brien M., Mau T., et Yung R. (2017) « Toll-like receptor 4 (TLR4) deficient mice are protected from adipose tissue inflammation in aging ». *Aging (Albany NY)* 9 (9): 1971-82. <https://doi.org/10.18632/aging.101288>

Giammanco, M., Tabacchi G., Giammanco S., Di Majo D., et La Guardia M. (2005) « Testosterone and Aggressiveness ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 11 (4): RA136-145.

Gilbert, Matthew J. H., Tanja C. Zerulla, et Keith B. Tierney. 2014. « Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model for the Study of Aging and Exercise: Physical Ability and Trainability Decrease with Age ». *Experimental Gerontology* 50 (février): 106-13. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.013>.

- Gladyshev, Vadim N. (2013) « The Origin of Aging: Imperfectness-Driven Non-Random Damage Defines the Aging Process and Control of Lifespan ». *Trends in Genetics* 29 (9): 506-12. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.004>
- Glasauer, A., et Navdeep S. Chandel. (2013) « ROS ». *Current Biology* 23 (3): R100-102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.011>
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., Carell, T., (2010) Tissue distribution of 5Hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One!* 5, e15367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>
- Goll, M.G., Bestor, T.H., (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
- Golomb, L., A. Sagiv, I. S. Pateras, A. Maly, V. Krizhanovsky, V. G. Gorgoulis, M. Oren, et A. Ben-Yehuda. (2015) « Age-Associated Inflammation Connects RAS-Induced Senescence to Stem Cell Dysfunction and Epidermal Malignancy ». *Cell Death et Differentiation* 22 (11): 1764-74. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.21>
- Gosling, S.D., (2001) From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Physiol. Bull.* 127, 45–86. <https://doi-org/10.1037/0033-2909.127.1.45>
- Grayson, D.R. et Guidotti, A., (2013) The Dynamics of DNA Methylation in Schizophrenia and Related Psychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp.138–166. <https://doi-org/10.1038/npp.2012.125>
- Gross, David S., Chowdhary, S., Anandhakumar, J., et S. Kainth A., 2015. « Chromatin ». *Current Biology* 25 (24): R1158-63. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.059>.
- Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., Xu, G. L. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606–612. <https://doi.org/10.1038/nature10443>
- Gupta, Sudhir, et Anshu Agrawal. 2013. « Inflammation et autoimmunity in human ageing: Dendritic cells take a center stage ». *The Indian Journal of Medical Research* 138 (5): 711-16.
- Guo, Junjie U., Keith E. Szulwach, Yijing Su, Yujing Li, Bing Yao, Zihui Xu, Joo Heon Shin, *et al.*,. (2014) « Genome-Wide Antagonism between 5-Hydroxymethylcytosine and DNA Methylation in the Adult Mouse Brain ». *Frontiers in Biology* 9 (1): 66-74. <https://doi.org/10.1007/s11515-014-1295-1>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.09.008>
- Harman, D. (1992) Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275, 257–66.
- Harman, D. 1956. « Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry ». *Journal of Gerontology* 11 (3): 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hawes, D. J., Brennan, J., and Dadds, M. R. (2009). Cortisol, callous-unemotional traits, and pathways to antisocial behavior. *Curr. Opin. Psychiatry* 22, 357–362. <https://doi.org/10.1097/yco.0b013e32832bfa6d>
- He YF *et al.*, (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333: 1303–1307 <https://doi-org/10.1126/science.1210944>
- Heard, E., (2013) Épigénétique et mémoire cellulaire. In Épigénétique et mémoire cellulaire. Collège de France. Available at: <http://books.openedition.org/cdf/2257>
- 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.
- Hoffmann AA (1999) Is the heritability for courtship and mating speed in *Drosophila* (fruit fly) low? *Heredity* 82(2):158–162 <https://doi-org.proxy.bib.ucl.ac.be:2443/10.1038/sj.hdy.6884640>
- Holliday, R. (1994) Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15: 453–457. <https://doi-org.proxy.bib.ucl.ac.be:2443/10.1002/dvg.1020150602>
- Holliday, R. (2006) Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics* 1: 76–80 Gross, David S., Surabhi Chowdhary, Jayamani Anandhakumar, et Amoldeep S. Kainth. 2015. « Chromatin ». *Current Biology* 25 (24): R1158-63. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.059>
- Holliday, R., Pugh, J.E., (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development, *Science*.
- Horvath, S. et Raj, K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet.* 19: 371–384. Springer US <https://doi-org.proxy.bib.ucl.ac.be:2443/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Hu, Chi-Kuo, et Anne Brunet. (2018) « The African turquoise killifish: A research organism to study vertebrate aging and diapause ». *Aging Cell* 17 (3). <https://doi.org/10.1111/accel.12757>.

Huang, K., et Fan, G. (2010). DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. *Review Regen. Med.*, 5, 531–544. <https://doi-org/10.2217/rme.10.35>

Hubená, P., Horký P., et Slavík O. (2021) « Performance of Cyprinids in Non-Reversing Mirrors versus Regular Mirrors in Tests of Aggressiveness ». *Journal of Ethology* 39 (1): 97-105. <https://doi.org/10.1007/s10164-020-00679-7>.

Hulthen K, Chapman BB, Nilsson PA, Hollander J, B.C., (2014) Express yourself: bold individuals induce enhanced morphological defences. *Proc. R. Soc.* 281, 20132703. <https://doi.org/doi:10.1098/rspb.2013.2703>

Hung, Y-F, Chen C-H, Li W-C, Wang T-F, et Hsueh Y-P. (2018) « Tlr7 Deletion Alters Expression Profiles of Genes Related to Neural Function and Regulates Mouse Behaviors and Contextual Memory ». *Brain, Behavior, and Immunity, Danger-associated molecular patterns in health and disease*, 72 (août): 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.006>

Huntingford FA, Turner AK, (1987) *Animal Conflict*. Boca Raton: Chapman et Hall/CRC

Huntingford, Felicity Ann. (1976) « The Relationship between Anti-Predator Behaviour and Aggression among Conspecifics in the Three-Spined Stickleback, *Gasterosteus Aculeatus* ». *Animal Behaviour* 24 (2): 245-60. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(76\)80034-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(76)80034-6)

Hurtado, G., Mabry, K.E., (2017) Aggression and boldness in Merriam's kangaroo rat: An urban tolerant species? *J. Mammal.* 98, 410–418. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw199>

Ito S *et al.*, (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5- formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333 : 1300–1303 <https://doi-org/10.1126/science.1210597>

Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., et Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 405–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258>

Jablonka, E., et J. Lamb M. (2002) « The Changing Concept of Epigenetics ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 981 (1): 82-96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04913.x>

Jang, H.S., Shin, W.J., Lee, J.E., Do, J.T., (2017) CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/genes8060148>

Jarman, S. N., M. Polanowski, A., E. Faux, C., Robbins, J., De Paoli-Iseppi, R., Bravington, M. et E. Deagle B. (2015) « Molecular Biomarkers for Chronological Age in Animal Ecology ». *Molecular Ecology* 24 (19): 4826-47. <https://doi.org/10.1111/mec.13357>

- Jeltsch, A., Nellen, W., Lyko, F., (2006) Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 31, 306–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.005>
- Jokinen, J., Chatzittofis, A., Hellström, C., Nordström, P., Uvnäs-Moberg, K., and Asberg, M. (2012). Low CSF oxytocin reflects high intent in suicide attempters. *Psychoneuroendocrinology* 37, 482–490. <https://doi-org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.016>
- Jones JS (1987) The heritability of fitness: bad news for good genes? *Trends Ecol Evol* 2(2):35–38 [https://doi-org/10.1016/0169-5347\(87\)90096-6](https://doi-org/10.1016/0169-5347(87)90096-6)
- Jones, P.A. et Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* (80-). 293 : 1068–1070. <https://doi-org/10.1126/science.1063852>
- Jones, P.A. (2012) Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jubb, R. A. (1971). A new *Nothobranchius* (Pisces, Cyprinodontidae) from Southeastern Rhodesia. *Journal of the American Killifish Association* 8, 12–19
- Kelleher, S.R., Silla, A.J., Byrne, P., (2018) Animal personality and behavioural syndromes in amphibians: a review of the evidence, experimental approaches, and implications for conservation. *Artic. Behav. Ecol. Sociobiol.* 72–79. <https://doi.org/10.1007/s00265P018P2493P7>
- Kellis, M., Birren, B.W. et Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–24. <https://doi-org/10.1038/nature02424>
- Kirkwood, T. B. L. et Cremer, T. (1982) Cytogeterontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum. Genet.* 60, 101–121 <https://doi-org/10.1007/bf00569695>
- Kirkwood, T. B. L. (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270, 301–304. <https://doi-org/10.1038/270301a0>
- Kirkwood, T. B. L. (1996) Human senescence. *BioEssays* 18, 1009–1016. <https://doi-org/10.1002/bies.950181211>
- Kirkwood, T. B. L. (1999) *Time of Our Lives: The Science of Human Ageing* (Oxford Univ. Press, New York)
- Kirkwood, Thomas B. L., et N. Austad. S. (2000) « Why Do We Age? » *Nature* 408 (6809): 233-38. <https://doi.org/10.1038/35041682>

Kishi, Shuji. (2014) « Using Zebrafish Models to Explore Genetic and Epigenetic Impacts on Evolutionary Developmental Origins of Aging ». *Translational Research, In-Depth Review: Zebrafish as a model organism for translational research*, 163 (2): 123-35. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.10.004>

Klimasauskas, S. *et al.*, (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, 76(2), pp.357–369. [https://doi-org/10.1016/0092-8674\(94\)90342-5](https://doi-org/10.1016/0092-8674(94)90342-5)

Klose, R.J. et Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31: 89–97. Elsevier Current Trends. <https://doi-org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>

Kodric-Brown, A. (1992). Male dominance can enhance mating success in guppies. *Animal Behaviour*, 44, 165e167. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80766-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80766-3)

Kouzarides, T., (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), pp.693–705. <https://doi-org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Kumar, C.M. et Rizvi, S.I. (2019) Invertebrate and vertebrate models in aging research. A review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 163. <https://doi-org/10.5507/bp.2019.003>

Kutschera, U. et Niklas, K.J. (2004) The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften* 91: 255–276. <https://doi-org/10.1007/s00114-004-0515-y>

Lacoste, N. et Côté, J., (2003) Le code épigénétique des histones. *Médecine/sciences*, 19(10), pp.955–959. <https://doi-org/10.1051/medsci/20031910955>

Larson ET, O'Malley DM, Melloni RH (2006) Aggression and vasotocin are associated with dominante subordinate relationships in zebrafish. *Behav Brain Res* 167(1):94–102 <https://doi-org/10.1016/j.bbr.2005.08.020>

Laurent, L.; Wong, E.; Li, G.; Huynh, T.; Tsigos, A.; Ong, C.T.; Low, H.M.; Kin Sung, K.W.; Rigoutsos, I.; Loring, J.; *et al.*, (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.*, 20, 320–331 <https://doi-org/10.1101/gr.101907.109>

Lee, R., Ferris, C., Van de Kar, L. D., and Coccaro, E. F. (2009). Cerebrospinal fluid oxytocin, life history of aggression and personality disorder. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1567–1573. <https://doi-org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.002>

Lehmann SM, Kruger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D, Habel P, Kalin R, Franzoni E, Rybak A, Nguyen D, Veh R, Ninnemann O, Peters O, Nitsch R, Heppner FL, Golenbock D, Schott E, Ploegh HL, Wulczyn FG, Lehnardt S (2012) An unconventional role for

miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 15:827–835. <https://doi-org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.00210.1038/nn.3113>

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86:973–983. [https://doi-org/10.1016/s0092-8674\(00\)80172-5](https://doi-org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5)

Lemaître, J-F, Berger V., Bonenfant C, Douhard M, Gamelon M, Plard F et Gaillard J-F. (2015) « Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1806). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0209>

Lenth, R. 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.

Levitis, Daniel A., Z. Lidicker, W., et Freund G. (2009) « Behavioural Biologists Do Not Agree on What Constitutes Behaviour ». *Animal Behaviour* 78 (1): 103-10. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.018>.

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. <https://doi-org/10.1016/j.exger.2019.03.002>

Li, L. et Dahiya, R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*.

Liang S, Domon H, Hosur KB, Wang M, Hajishengallis G. (2009) Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. *Mech Ageing Dev* ; 130:538–546. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.06.006>

Liu, Jian-Feng, Ruyan Wu, et Jun-Xu Li. (2019) « Toll of Mental Disorders : TLR-Mediated Function of the Innate Immune System ». *Neuroscience Bulletin* 35 (4): 771-74. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-00335-8>.

Lister R *et al.*, (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341:1237905 <https://doi-org/10.1126/science.1237905>

López-Otín, C., A. Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., et Kroemer, G., (2013) « The Hallmarks of Aging ». *Cell* 153 (6): 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.

Lüdecke D, Ben-Shachar M, Patil I, Waggoner P, Makowski D (2021). “performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models.” *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3139. <https://doi:10.21105/joss.03139>.

Lubin, D. A., Elliott, J. C., Black, M. C., and Johns, J. M. (2003). An oxytocin antagonist infused into the central nucleus of the amygdala increases maternal aggressive behavior. *Behav. Neurosci.* 117, 195–201. <https://doi-org/10.1037/0735-7044.117.2.195>

Luckinbill, L. S., Arking, R., Clare, M. J., Cirocco, W. C. et Buck, S. A. (1984) Selection of delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38, 996–1003. <https://doi-org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb00369.x>

Luiz, D. P., Dias Santos Júnior C., Maria Bonetti A., et Antônio Manfredi Brandeburgo M. (2014) « Tollip or Not Tollip: What Are the Evolving Questions behind It? » *PLoS ONE* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097219>.

Lushaj E.B, Johnson J. K., D. Mckenzie, J.M. Aiken (2008) Sarcopenia accelerates at advanced ages in Fisher 344xBrown Norway rats *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 63 (9) (2008), pp. 921-927 <https://doi.org/10.1093/gerona/63.9.921>

Lutz, Charles T., et LeBris S. Quinn. (2012) « Sarcopenia, Obesity, and Natural Killer Cell Immune Senescence in Aging: Altered Cytokine Levels as a Common Mechanism ». *Aging* 4 (8): 535-46. <https://doi.org/10.18632/aging.100482>

Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C. et Maleszka, R. (2010) The honeybee epigenomes: Differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 8: e1000506. <https://doi-org/10.1371/journal.pbio.1000506>

Lyu, A-k, Shi-yu Z, Jin-liang Ch, Yu-xing Zh, Die P, Cheng L, Qiong L, *et al.*,. 2019. « Inhibition of TLR9 Attenuates Skeletal Muscle Fibrosis in Aged Sarcopenic Mice via the P53/SIRT1 Pathway ». *Experimental Gerontology* 122 (juillet): 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.04.008>.

Mark A, Kristen H, Monica B, Flora E, Ashleigh M, Zainab A-M, Ilhem M (2012) Age-dependent changes in innate immune phenotype and function in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2: 10.3402/pba.v2i0.18052.

Mariño-Ramírez, L. Hsu B., Baxevasis A. D., Landsman D.(2006) The Histone Database: a comprehensive resource for histones and histone fold-containing proteins. *Proteins*, 62(4), pp.838–42. <https://doi-org/10.1002/prot.20814>

Martin, W.F., Garg, S. et Zimorski, V. (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370: 20140330. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330>

Masser, Dustin R., Hadad N., Porter H., B. Stout M., Unnikrishnan A., R. Stanford D., et M. Freeman W. (2018) « Analysis of DNA Modifications in Aging Research ». *GeroScience* 40 (1): 11-29. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0005-3>

Mattson, Mark P., et Thiruma V. Arumugam. (2018) « Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States ». *Cell metabolism* 27 (6): 1176-99. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>

McGlothlin JW, Moore AJ, Wolf JB, Brodie ED III (2010) Interacting phenotypes and the evolutionary process. III. Social evolution. *Evolution* 64(9):2558–2574 <https://doi-org/10.1111/j.1558-5646.2010.01012.x>

McMurray, M. S., Joyner, P. W., Middleton, C. W., Jarrett, T. M., Elliott, D. L., Black, M. A., *et al.*,. (2008). Intergenerational effects of cocaine on maternal aggressive behavior and brain oxytocin in rat dams. *Stress* 11, 398–410. <https://doi-org/10.1080/10253890701850239>

Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology* (Lewis, London).

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394–397 <https://doi-org/10.1038/41131>

Mei, X-F, Wei S, Yao-Yao Z, Bin Z, Yu-Rui W, Lin-Jing H, Wen-Ping Zh. 2019. « DNA methylation and hydroxymethylation profiles reveal possible role of highly methylated TLR signaling on *Fasciola gigantica* excretory/secretory products (FgESPs) modulation of buffalo dendritic cells ». *Parasites et Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3615-4>.

Merila J, Sheldon BC (1999) Genetic architecture of fitness and non-fitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity* 83(2):103–109 <https://doi-org/10.1046/j.1365-2540.1999.00585.x>

Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P., and Heinrichs, M. (2011). Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 524–538. <https://doi-org/10.1038/nrn3044>

Mommersteeg, Paula M. C., Vermetten P., Kavelaars A., Geuze E., et J. Heijnen C. (2008) « Hostility Is Related to Clusters of T-Cell Cytokines and Chemokines in Healthy Men ». *Psychoneuroendocrinology* 33 (8): 1041-50. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.05.007>.

Monti, N., A. Cavallaro R., Stoccoro A., Nicolia V., Scarpa S., G. Kovacs G., Fiorenza M. T., *et al.*,. (2020) « CpG and non-CpG Presenilin1 methylation pattern in course of neurodevelopment and neurodegeneration is associated with gene expression in human and murine brain ». *Epigenetics* 0 (0): 1-19. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1722917>

Moore AJ, Brodie ED III, Wolf JB (1997) Interacting phenotypes and the evolutionary process. I. Direct and indirect genetic effects of social interactions. *Evolution* 51(5):1352–1362 <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1997.tb01458.x>

Moore, L.D., Le, T. et Fan, G., (2013) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp.23–38. <https://doi-org/10.1038/npp.2012.112>

Moreira, P. S. A., K. G. T. Pulman, et T. G. Pottinger. (2004) « Extinction of a Conditioned Response in Rainbow Trout Selected for High or Low Responsiveness to Stress ». *Hormones and Behavior* 46 (4): 450-57. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.003>.

Moskalev, A., Stambler I., et Caruso C. (2020) « Innate and Adaptive Immunity in Aging and Longevity: The Foundation of Resilience ». *Aging and Disease* 11 (6): 1363. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0603>.

Nelson, Randy J., et Brian C. Trainor. (2007) « Neural Mechanisms of Aggression ». *Nature Reviews Neuroscience* 8 (7): 536-46. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>

Nie, Li, Shi-Yu Cai, Jian-Zhong Shao, et Jiong Chen. (2018) « Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01523>

Niehrs, Christof, et Cornelis F. Calkhoven. (2020) « Emerging Role of C/EBP β and Epigenetic DNA Methylation in Ageing ». *Trends in Genetics* 36 (2): 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.11.005>.

Niemela, P.T., DiRienzo, N., Hedrick, A. V., (2012) Predator-induced changes in the boldness of naïve field crickets, *Gryllus integer*, depends on behavioural type. *Anim. Behav.* 84, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.04.019>

Norouzitalab, P., Baruah K., Vanrompay D., et Bossier P. (2019) « Can Epigenetics Translate Environmental Cues into Phenotypes? » *Science of The Total Environment* 647 (janvier): 1281-93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.063>

Norris, R.D. 1996. Symbiosis as an evolutionary innovation in the radiation of Paleocene planktic foraminifera. *Paleobiology* 22: 461–480. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0094837300016468>

Norton, William H. J., Stumpfenhorst K., Faus-Kessler T., Folchert A., Rohner N., P. Harris M., Callebert J., et Bally-Cuif L. (2011) « Modulation of Fgfr1a Signaling in Zebrafish Reveals a Genetic Basis for the Aggression–Boldness Syndrome ». *The Journal of Neuroscience* 31 (39): 13796-807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2892-11.2011>

Norton, William H. J., et Héctor Carreño Gutiérrez. (2019) « The Three-Spined Stickleback as a Model for Behavioural Neuroscience ». PLOS ONE 14 (3): e0213320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213320>.

Nutt, D. J. (2008). Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry* 69, 4–7.

Okun, E., Griffioen, K.J., and Mattson, M.P. (2011). Toll-like receptor signalling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34, 269–281. <https://doi-org/10.1016/j.tins.2011.02.005>

Olivieri, F., Rita Rippo M., Prattichizzo F., Babini L., Graciotti L., Recchioni R., et Domenico Procopio A. (2013) « Toll like Receptor Signaling in “Inflammaging”: MicroRNA as New Players ». *Immunity et Ageing* 10 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-11>.

Olins, D.E. et Olins, A.L., (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(10), pp.809–814. <https://doi-org/10.1038/nrm1225>

Olson-Manning CF, Wagner MR, Mitchell-Olds T. (2012) Adaptive evolution: evaluating empirical support for theoretical predictions. *Nat Rev Genet.* 13 : 867–877. <http://doi.org/10.1038/nrg332>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jelekin.2014.09.003>

Øverli Ø, Harris CA, Winberg S, (1999) Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav Evol* 54:263–275. <https://doi-org/10.1159/000006627>

Owen R. Jones, Alexander S, Roberto S-G, Carlo G.C, Ralf S, Brenda B. C, Johan P. D, Johan E, María B. G, Eric S. M, Pedro F. Q-A, Hal C, Annette B, and James W. V (2014) *Nature.* 505(7482) : 169–173. <https://dx-doi-org/10.1038%2Fnature12789>

Pal, S., et K. Tyler J. (2016) « Epigenetics and Aging ». *Science Advances* 2 (7): e1600584. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600584>

Park, Se Jin, Jee Youn Lee, Sang Jeong Kim, Se-Young Choi, Tae Young Yune, et Jong Hoon Ryu. 2015. « Toll-like Receptor-2 Deficiency Induces Schizophrenia-like Behaviors in Mice ». *Scientific Reports* 5 (1): 8502. <https://doi.org/10.1038/srep08502>.

Partridge, L., Prowse, N. et Pignatelli, P. (1999) Another set of responses and correlated responses to selection on age of reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 255–261. <https://doi-org/10.1098/rspb.1999.0630>

Pincus Z, Smith-Vikos T, Slack FJ (2011) MicroRNA predictors of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 7, e1002306. <https://doi-org/10.1371/journal.pgen.1002306>

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and the R Development Core Team (2013). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-108.

Platzer, M., et Englert C. (2016) « *Nothobranchius Furzeri*: A Model for Aging Research and More ». *Trends in Genetics* 32 (9): 543-52. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.006>

Podrabsky, J. E., et Hand, S. C. (2000). Depression of protein synthesis during diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Physiological and Biochemical Zoology* : PBZ, 73(6), 799–808. <https://doi.org/10.1086/318106>

Polačik ,M.et Reichard, M. (2010). Diet overlap among three sympatric African annual killifish species (*Nothobranchius* spp.) from Mozambique. *Journal of Fish Biology* 77, 754–768. <https://doi-org/10.1111/j.1095-8649.2010.02717.x>

Polačik, M., Blažek R., et Reichard, M. (2016) « Laboratory Breeding of the Short-Lived Annual Killifish *Nothobranchius Furzeri* ». *Nature Protocols* 11 (8): 1396-1413. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.080>.

Poustka, L., Maras, A., Hohm, E., Fellingner, J., Holtmann, M., Banaschewski, T., *et al.*,. (2010). Negative association between plasma cortisol levels and aggression in a high-risk community sample of adolescents. *J. Neur Transm.* 117, 621–627. <https://doi-org/10.1007/s00702-010-0386-7>

Qian, F., Xiaomei W., Lin Z., Shu C., Piecychna M., Allore H., Bockenstedt L., *et al.*,. 2012. « Age-associated elevation in TLR5 leads to increased inflammatory responses in the elderly ». *Aging Cell* 11 (1): 104-10. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00759.x>.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ramos, A., Deepa A., D. Cardoso S., et Gonçalves D. (2021) « Androgens and Corticosteroids Increase Response to Mirror Images and Interacting Conspecifics in Males of the Siamese Fighting Fish *Betta Splendens* ». *Hormones and Behavior* 132 (juin): 104991. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.104991>.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A. et Cairns, B.R. (2008). DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, 135, 1201–1212. <https://doi-org/10.1016/j.cell.2008.11.042>

Rasband, W.S. 2018. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Réale, Denis, Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N., Wright, J. 2010. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. *Philos. Trans. R. Soc. B* 365, 3937–3946. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0222>

Reale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal Temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 82, 291–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469P185X.2007.00010.x>

Reichard, M. et Polačik, M. (2019) *Nothobranchius furzeri*, an “instant” fish from an ephemeral habitat. *Elife* 8. <https://doi-org/10.7554/elife.41548>

Reichard, M., M. Polacik and O. Sedlacek, (2009) Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest lifespan. *J. Fish Biol.* 74: 198–212 <https://doi-org/10.7554/elife.41548>

Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., ... Platzer, M. (2015). Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell*, 163(6), 1527–1538. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.071>

Relton, C.L. et Smith, G.D. (2010) Epigenetic epidemiology of common complex disease: Prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med.* 7. <https://doi-org/10.1371/journal.pmed.1000356>

Renfree, M.B. et Shaw, G. (2000) Diapause. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 353–375. <https://doi-org/10.1146/annurev.physiol.62.1.353>

Ridgway ID, Richardson CA (2011) *Arctica islandica*: the longest lived non colonial animal known to science. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 297–310. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9171-9>

Riggs, A.D., Porter, T.N., (1996) Overview of Epigenetic Mechanisms, in: *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, pp. 29– 45. <https://doi.org/10.1101/087969490.32.29>

Roche, Dominique G., Careau, V., et A. Binning S. (2016) « Demystifying Animal 'Personality' (or Not): Why Individual Variation Matters to Experimental Biologists ». *Journal of Experimental Biology* 219 (24): 3832-43. <https://doi.org/10.1242/jeb.146712>

Rosa C, Zeh J, George JC *et al.*,. (2013) Age estimates based on aspartic acid racemization for bowhead whales (*Balaena mysticetus*) harvested in 1998–2000 and the relationship between racemization rate and body temperature. *Marine Mammal Science*, 29, 424–445. <https://doi-org/10.1111/j.1748-7692.2012.00593.x>

Rose, M. R. (1991) *Evolutionary Biology of Ageing* (Oxford Univ. Press, New York).

Rose, M., et Charlesworth B. (1980) « A Test of Evolutionary Theories of Senescence ». *Nature* 287 (5778): 141-42. <https://doi.org/10.1038/287141a0>

Royle, N. J., Lindstrom, J. et Metcalfe, N. B. 2005. A poor start in life negatively affects dominance status in adulthood independent of body size in green swordtails, *Xiphophorus helleri*. *Proceedings of the Royal Society B*, 272, 1917e1922. <https://doi-org/10.1098/rspb.2005.3190>

Ruiz-Gomez, M.L.;Huntingford,F.A., (2012) Boldness and aggressiveness in early and late hatchedthree-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.* 81, 966–976. <https://doi-org/10.1111/j.1095-8649.2012.03340.x>

Russo, V.E.A., R.A. MARTIENSSEN et A.D. RIGGS, Eds. (1996) *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation* (Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Ruyschaert JM, Lonez C. (2015) Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. *Biochim Biophys Acta* 1848(9):1860–7. <https://doi-org/10.1016/j.bbamem.2015.03.014>

Salonen, A., Peuhkuri, N., (2006) The effect of captive breeding on aggressive behaviour of European grayling, *Thymallus thymallus*, in different contexts. *Anim. Behav.* 72, 819–825. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2005.12.012>

Schafer, A. *et al.*,. (2018) Impaired DNA demethylation of C/EBP sites causes premature aging. *Genes Dev.* 32, 742–762 <https://doi-org/10.1101/gad.311969.118>

Scherer, U., Buck, M. et Schuett W. (2016) « Lateralisation in Agonistic Encounters: Do Mirror Tests Reflect Aggressive Behaviour? A Study on a West African Cichlid ». *Journal of Fish Biology* 89 (3): 1866-72. <https://doi.org/10.1111/jfb.13069>.

Schuster, A.C., Carl, T., Foerster, K., (2017) Repeatability and consistency of individual behaviour in juvenile and adult Eurasian harvest mice. *Sci Nat* 104. <https://doi.org/10.1007/s00114P017P1430P3>

- Schübeler, D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517: 321–326. <https://doi.org/10.1038/nature14192>
- Sen, Payel, P. Shah P., Nativio R., et L. Berger S. (2016) « Epigenetic mechanisms regulating longevity and aging ». *Cell* 166 (4) : 822-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>.
- Seo, D., Patrick, C. J., and Kennealy, P. J. (2008). Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. *Aggress. Violent Behav.* 13, 383–395. <https://doi-org/10.1016/j.avb.2008.06.003>
- Serra, M., Wolkers, C. P. B., Mello, M. M. M. et Urbinati E. C. (2017) « Agonistic Trials with Mirrors Do Not Elicit the Same Aggressiveness of a Real Trial in the Matrinxã Fish, *Brycon Amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) ». *Journal of Applied Ichthyology* 33 (1): 42-46. <https://doi.org/10.1111/jai.13198>.
- Shaw, Albert C., Panda A., R. Joshi S., Qian F., G. Allore H., et R. Montgomery R. (2011) « Dysregulation of Human Toll-like Receptor Function in Aging ». *Ageing research reviews* 10 (3): 346-53. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.10.007>
- Shoal, G. D., Giancola, P. R., and Kirillova, G. P. (2003). Salivary cortisol, personality, and aggressive behavior in adolescent boys: a 5-year longitudinal study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 42, 1101–1107. <https://doi-org/10.1097/01.chi.0000070246.24125.6d>
- Shuang Z, Min Y, Qiang G, Li R, Li G, Tan S, *et al.*,. (2015) Annexin A2 binds to endosomes and negatively regulates TLR4-triggered inflammatory responses via the TRAM-TRIF pathway. *Sci Rep* 5(33):15859. <https://doi-org/10.1038/srep15859>
- Sih, A, Bell, A., Johnson, J.C., (2004) Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary
- Sih, A., Bell, A.M., (2008) Insights for Behavioral Ecology from Behavioral Syndromes. *Adv Study Behav* 3454. [https://doi.org/10.1016/S0065P3454\(08\)00005P3.Insights](https://doi.org/10.1016/S0065P3454(08)00005P3.Insights)
- Sih, A., Watters, J. V, (2005) The mix matters: behavioural types and group dynamics in water striders, *Behaviour*. <https://doi.org/10.1163/156853905774539454>
- Sih, A., Stamps, J., H. Yang, L., McElreath, R., et Ramenofsky. M., (2010) « Behavior as a Key Component of Integrative Biology in a Human-Altered World ». *Integrative and Comparative Biology* 50 (6): 934-44. <https://doi.org/10.1093/icb/icq148>
- Sih, A., J. Mathot K., Moirón N., Montiglio P-O, Wolf M., et J. Dingemanse N. (2015) « Animal Personality and State–Behaviour Feedbacks: A Review and Guide for Empiricists ». *Trends in Ecology et Evolution* 30 (1): 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.004>

Skinner, A. M. J. (2004) Sexual selection in the zebrafish (*Danio rerio*) and in the Guppy (*Poecilia reticulata*). Ph.D. thesis, University of Sheffield. <https://doi-org/10.1089/zeb.2008.0548>

Skinner, M. K. (2015). Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. *Genome Biology and Evolution*, 7(5), 1296–1302. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv073>

Splunter, M. V., Perdijk O., Fick-Brinkhof H., G. Floris-Vollenbroek E., Meijer B., Brugman S., F. J. Savelkoul H., van Hoffen E., et R. J. Joost van Neerven. (2019) « Plasmacytoid dendritic cell and myeloid dendritic cell function in ageing: A comparison between elderly and young adult women ». *PLoS ONE* 14 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225825>.

Stamps, J.A., Groothuis, T.G.G., (2010) Developmental perspectives on personality: Implications for ecological and evolutionary studies of individual differences. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 4029–4041. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0218>

Stedman, Edgar, Stedman, Ellen, (1950) Cell Specificity of Histones. *Nature* 166, 780–781. <https://doi.org/10.1038/166780a0>

Stirling DG, Reale D, Roff DA (2002) Selection, structure and the heritability of behaviour. *J Evol Biol* 15(2):277–289

Stoffel, M. A., Nakagawa, S. and Schielzeth, H. (2017), rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol*, 8: 1639–1644. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12797>.

Stout-Delgado, H. W., Yang X., E. Walker W., M. Tesar B., et R. Goldstein D. (2008) « Aging Impairs IFN Regulatory Factor 7 Up-Regulation in Plasmacytoid Dendritic Cells during TLR9 Activation ». *The Journal of Immunology* 181 (10): 6747-56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6747>.

Sun, Y., et Li Q. (2018) « DMP in the putative promoter region of TLR9 in the superior temporal gyrus postmortem brain tissue in patients with Alzheimers disease. » *Journal of Neurology and Neurorehabilitation Research* 03 (janvier). <https://doi.org/10.35841/neurology-neurorehabilitation.3.1.22-25>.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, *et al.*,. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3516–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400525101>

- Takahashi, A., E. Flanigan M., S. McEwen B., et J. Russo S. (2018) « Aggression, Social Stress, and the Immune System in Humans and Animal Models ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12: 56. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00056>.
- Takeuchi O, Akira S (2009): Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 227: 75-86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x>.
- Tang, W.W.C. *et al.,,* (2015) A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell*, 161(6), pp.1453–1467. <https://doi-org/10.1016/j.cell.2015.04.053>
- Teles, Magda C., et F. Oliveira R. (2016) « Quantifying Aggressive Behavior in Zebrafish ». In *Zebrafish*, édité par Koichi Kawakami, E. Elizabeth Patton, et Michael Orger, 1451:293-305. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3771-4_20.
- Terzibasi, E., Riccardo, D., et Cellerino, A. (2007). The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Experimental Gerontology* 42, 42, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.039>
- Terzibasi, E., Riccardo Valenzano D., Benedetti M., Roncaglia P., Cattaneo A., Domenici L., et Cellerino A. (2008) « Large Differences in Aging Phenotype between Strains of the Short-Lived Annual Fish *Nothobranchius furzeri* ». *PLoS ONE* 3 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003866>
- Thoré, Eli S. J., Laure Steenaerts, Charlotte Philippe, Arnout Grégoir, Luc Brendonck, et Tom Pinceel. (2018) « Individual Behavioral Variation Reflects Personality Divergence in the Upcoming Model Organism *Nothobranchius Furzeri* ». *Ecology and Evolution* 8 (16): 8448-57. <https://doi.org/10.1002/ece3.4356>
- Thoré, Eli S. J., Luc Brendonck, et Tom Pinceel. 2020. « Conspecific Density and Environmental Complexity Impact Behaviour of Turquoise Killifish (*Nothobranchius Furzeri*) ». *Journal of Fish Biology* 97 (5): 1448-61. <https://doi.org/10.1111/jfb.14512>.
- Toms, N. C., Echevarria, D. J., and Jouandot, D.J. (2010) Methodological review of Personality-related Studies in fish: Focus on the shy-bold axis of behavior. *Int. J. Comp.Psychol.*23,125.
- Tozzini, Terzibasi E., Baumgart M., Battistoni G., et 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 (2): 241-51. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00781.x>

Tremblay, R.E., Vitaro, F., and Cote, S.M., (2018) Developmental origins of chronic physical aggression: a bio-psycho-social model for the next generation of preventive interventions, *Annu. Rev. Psychol.*, vol. 69, pp. 383–407. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044030>

Troubat R., Barone P., Leman S., Desmidt T., Cressant A., Atanasova B., Brizard B., *et al.*,. 2021. « Neuroinflammation and Depression: A Review ». *European Journal of Neuroscience* 53 (1): 151-71. <https://doi.org/10.1111/ejn.14720>.

Tuminello, Elizabeth R., et S. Duke Han. 2011. « The Apolipoprotein E Antagonistic Pleiotropy Hypothesis: Review and Recommendations ». Review Article. *International Journal of Alzheimer Disease*. Hindawi. 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/726197>

Uematsu, K. et Yamamori, K. (1982) Body vibration as a timing cue for spawning in chum salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72, 591e594. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90128-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90128-1)

Uglem I, Belchier M, Svasand T (2005) Age determination of european lobsters (*Homarus gammarus* L.) by histological quantification of lipofuscin. *Journal of Crustacean Biology*, 25,95–99. <https://doi.org/10.1651/C-2448>

D.M. Underhill, A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, A. Aderem (1999), The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens *Nature*, 401 pp. 811-815 <https://doi.org/10.1038/44605>

Valdesalici, S., et Cellerino A. (2003) « Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. » *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (Suppl 2): S189-91. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0048>

Valenzano, D. R., Benayoun, B. A., Singh, P. P., Zhang, E., Etter, P. D., Hu, C. K., ... Brunet, A. (2015). The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell*, 163(6), 1539–1554. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.008>

Vidya M, Kumar V, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. (2018) Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol* 37(1):20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>

Valenzano, Dario R., Eva Terzibas, Tyrone Genade, Antonino Cattaneo, Luciano Domenici, *et al.*, essandro Cellerino. (2006) « Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate ». *Current Biology* 16 (3): 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.038>.

Waddington, C.H. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.

Wallet S, Puri V, Gibson F. (2018) Linkage of infection to adverse systemic complications: periodontal disease, toll-like receptors, and other pattern recognition systems. *Vaccines (Basel)* 6(2):E21. <https://doi-org/10.3390/vaccines6020021>

Wang, X.P.D., Cortés, M.R., Arthur, M., Der Kooij, V., Takahashi, A., Flanigan, M.E., Mcewen, B.S., Russo, S.J., (2018) Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. *Front. Behav. Neurosci.* | www.frontiersin.org 12, 56. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00056>

Weismann A. (1891) *Essays upon heredity and kindred biological problems*. In (Oxford: Clarendon Press).

West, M. D., Sternberg, H., Labat, I., Janus, J., B.Chapman, K., Nafees N.M., DNJ de Grey A. et Dana L. (2019), *Regenerative medicine* Vol 14, NO.9. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0062>

Wildekamp, R. H. (2004). *A World of Killies: Atlas of the Oviparous Cyprinodontiform Fishes of the World (Volume 4)*. American Killifish Association, Elyria.

Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11, 398–411.

Wilson AJ, Gelin U, Perron M-C, Re´ale D (2009) Indirect genetic effects and the evolution of aggression in a vertebrate system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 276(1656):533–541 <https://doi-org/10.1098/rspb.2008.1193>

Winandy, L. & Denoël, M. (2013) Cues from Introduced Fish Alter Shelter Use and Feeding Behaviour in Adult Alpine Newts. *Ethology* 119: 121–129. <https://doi-org/10.1111/eth.12043>

Winberg, Svante, et Per-Ove Thörnqvist. (2016) « Role of Brain Serotonin in Modulating Fish Behavior ». *Current Zoology* 62 (3): 317-23. <https://doi.org/10.1093/cz/zow037>

Wolf JB, Brodie ED III, Cheverud JM, Moore AJ, Wade MJ (1998) Evolutionary consequences of indirect genetic effects. *Trends Ecol Evol* 13(2):64–69 [https://doi-org/10.1016/s0169-5347\(97\)01233-0](https://doi-org/10.1016/s0169-5347(97)01233-0)

Wolf, M., Weissing, F.J., (2012) Anima personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 27, 452–61. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.001>

Wolf, M., Ivan Doorn, G.S., Leimar, O., Weissing, F.J., (2007) Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature* 447, 581–4. <https://doi.org/10.1038/nature05835>

Wu, H. et Zhang, Y., (2011) Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes et Development*, 25(23), pp.2436–2452. <https://doi-org/10.1101/gad.179184.111>

Wu, X., et Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 18, 517. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>

Wyatt, T.D., 2017. *Animal behaviour: a very short introduction*. Oxford University Press.

Xia, X., Chen, W., McDermott, J., et Jackie Han J-D. 2017. « Molecular and Phenotypic Biomarkers of Aging ». *F1000Research* 6 (juin): 860. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10692.1>

Yang, C.-H., Lin, Y.-D., Chiang, Y.-C. et Chuang, L.-Y. 2016. A Hybrid Approach for CpG Island Detection in the Human Genome. *PLoS One* 11: e0144748. Public Library of Science.

Zarros, A. Ch., Konstantina S K., et Stylianos Th Tsakiris. s. d. (2005) « Serotonergic Impairment and Aggressive Behavior in Alzheimer' s Disease » *Acta Neurobiol Exp* 65: 277-286.

Zhang, W. et Xu, J. (2017) DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark. Res.* 5: 1. <https://doi-org/10.1186/s40364-017-0081-z>

Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J., Lu, W., et al. (2018). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *J. Neuroinflammation* 15, 1–14. <https://doi-org/10.1186/S12974-017-1052-X>

Zhao, S. *et al.,.*, (2010) Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science*, 327(5968). <https://doi-org/10.1126/science.1179689>

Zimorski V, Martin W.F., Gould S.B. et Ku C (2014) Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*, volume 22, Pages 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.008>

Annexe

Annexe 1 : Séquences des amorces utilisés pour le pyroséquençage

<i>Séquence amplifiée</i>	<i>Type de primer</i>	<i>Séquence</i>
<i>TLR2 intron 1</i>	Forward	TGAATTTAGATAAATAGGGTTGTGAAA
	Reverse	AACTAAAAACCAAAAACCAAACTAA
	Sequencing	GTAGTTGGTTTTTTGATTTTTTTA
<i>TLR5 intro 3</i>	Forward	GATAGATGTTTTTTTATTTAGTTTGGAGAT
	Reverse	ACTCCAAAAAATCCCACAAAATACA
	Sequencing	AGTTTGGAGATTTTTTATTTTTTAA
<i>TLR7 Intron 5</i>	Forward	TGGTATATTTATTATTTTTGTAGGGTTAAG
	Reverse	TCCCTCATCACCCACTCA
	Sequencing	GGTTAAGTTTAAAGGTTATGG
<i>TLR9 promoteur</i>	Forward	AGGAATTTTGAGTTTAATATGTAGGTTG
	Reverse	ACAAAAACAACCTTTCCCAATTTCA
	Sequencing	TGAGTTTAATATGTAGGTTGA
<i>TOLLIP intron 2</i>	Forward	ATTGAGTGTTAGATTGGAGAAGT
	Reverse	TCACTAAACCAAAACCCAATCC
	Sequencing	TGTTAGATTGGAGAAGTT
<i>TOLLIP promoteur</i>	Forward	GGTTTTAAAAGGAGATTATAGAAGTTGT
	Reverse	CTACCTTCACCCAAAACA
	Sequencing	AAAGGAGATTATAGAAGTTGTA

Annexe 1 : Séquences analysées en pyroséquençage après traitement bisulfite

Location	Séquence
<i>TLR2 intron 1</i>	GTTGTAGAYGTGATYGTGTTGTAGAGTTTTGATATTTAGAGTAAATTAG TYGTTTTAYGTTTTYGGGYGTGTTYGTTTTTTGATAGAYGTAAAGG AAAYGTYGT
<i>TLR5 intro 3</i>	ATAATTTTTAGTTTTTTTGGATTTYGATTGTTTTYGGTYGTTYGTTAT TTTAGTTTGTTAGTTAATYGTTTTATTGTGA
<i>TLR7 Intron 5</i>	TYGTTTGTATTTAAGAGYGTAGTTAYGAYGTATTTGTGGTTAYGAT AAAGATGATTTYGTYGTAT
<i>TLR9 promoteur</i>	AYGTGAAAATAGTTTTTATTTTTATTTTTGTATTAGTAYGGAAAATY GTTTAGTTTYGAAAAGATTGATAGATTTATGTYGTATTTTTATTTAATA TTTATGGATTTAATYGTTTTTGT
<i>TOLLIP intron 2</i>	TAAAGGATATGATYGTATYGGYGGTGTAGATGAGYGTGGATTATT TATATTTAAGGGAGTTTTAYGAGTAGTAGGTGTGTGGAGGATGTTAT AGAGTTTATATAATTTTAATTGGGTTYGT
<i>TOLLIP promoteur</i>	GATATTYGGGAGAYGGTATGGYGATTATTATGAGATTTAGAGAGGAT AGGTAAYGYGTATTYGAGTTTTTTGTTATGGAAATAATAAATATTTAGTT TTTAGTYGGATTTTYGGATAAYGTTTTTTTTTATT

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées en qPCR

GOI	N° amorce	Forward	Reverse
TOLLIP	1	CAGCTACAATCCAGCGTGTT	TCACTGCTGCTGGTAAGGAC
	2	CCCACAGACCAGCATCATAG	CTCACATGCAGCATCTCCTT
	3	CATTCGGTTGGTTGTGAAAG	GTGGGATTAGCCATCCAGTT
TLR5	1	GGTCCAAAGATGAGCCCTAA	AGGAAGTCTCTGGCCTCAA
	2	TCAGCGATTCTCCAGATGAG	TCTGTTAATGCTGGGAGCAG
TLR7	1	GGAGATGTGCAGTCATTTGG	CTCTGGGAAAGGTTGTCGAT
	2	GGGAGATGTGCAGTCATTTG	CTCTGGGAAAGGTTGTCGAT
	3	GGAGATGTGCAGTCATTTGG	GATGCTCTGGGAAAGGTTGT
TLR2	1	ATCCTCATCCTCTCCCTGTG	AGTCAGGTCATTGTCCGGTCA
	2	ATCCTCATCCTCTCCCTGTG	GACCAGTCAGGTCATTGTCCG
TLR9	1	GGCAACAGGAGGTTTCAACT	TGCTGAACCATGAAGAAAGC
	2	GTTCTGGCCTTTCGTGTAT	CGTTTACCACCTCACATCCA
House keeping genes			
TBP	1	CGGTTGGAGGGTTTAGTCCT	GCAAGACGATTCTGGGTTTG
ACTB-1	1	CCTTCCTCCTCGGTATGG	AGGTGGGGCAATGATCTTAATC
GAPDH-1	1	AAAGTCGGAATCAATGGATTTGC	TTAGTCGGGTCCCTCTCGTG
eEF1A-1	1	GTGGAAGTTTGAGACCAGCAAG	CAACACCAGCAGCAACAATC

Choix des variables explicatives pour l'analyse 1

La conductivité (notée Sal), la température, la taille ainsi que l'âge (timepoint) étaient à ma disposition pour cette analyse. Une charte des corrélations a permis de mettre en valeur une corrélation négative significative entre la température et la taille (**figure 1 supplémentaire**). De plus, en faisant le graphe de l'évolution de la taille en fonction de l'âge (qui est une variable prise par défaut), on y observe une corrélation positive comme sur la **figure supplémentaire 2**. Le choix des variables explicatives se porte donc sur la conductivité (ici Sal), la température ainsi que timepoint.

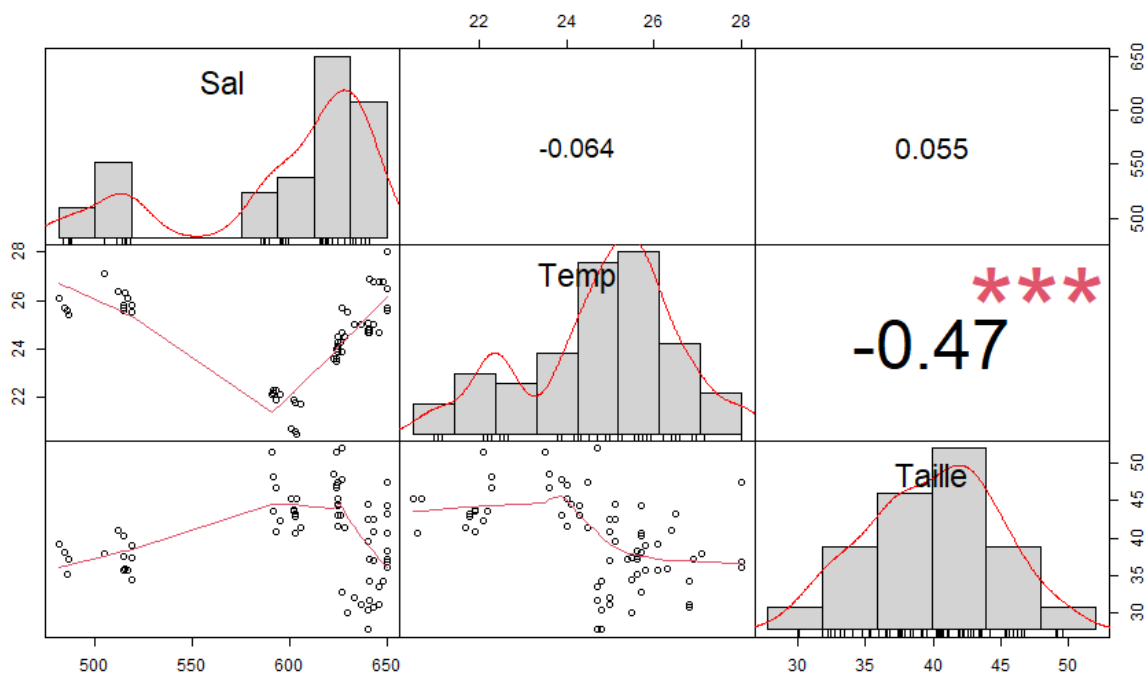


Figure supplémentaire 1 : Charte de corrélation de l'ensemble des variables explicatives pour l'analyse 1

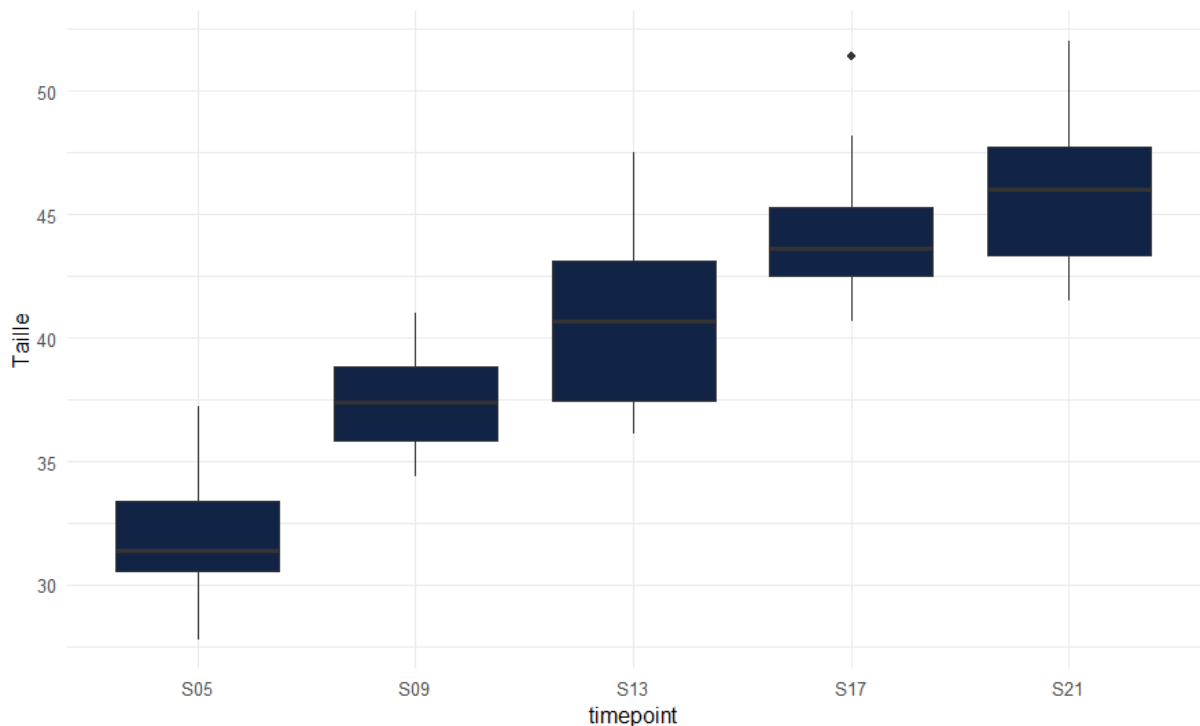


Figure supplémentaire 2 : Graphe représentant l'évolution de la taille en fonction de l'âge chez les 14 individus testés.

Choix des variables réponses pour l'analyse 1

Huit variables réponses potentielles étaient à ma disposition lors de cette analyse. Sur base de l'ACP (**fig 3 et 4 supplémentaire**), on peut observer que les variables qui ont les plus grosses contributions dans les deux dimensions principales (et qui explique 67,6% de la variabilité) sont RTDM (distance parcourue relative), PZinterm(proportion dans la zone intermédiaire), Bite(morsures), LFB (latence avant la première morsure), Pzeloign(proportion dans la zone éloignée) et Pzproche(proportion dans la zone proche). Cependant, Pzproche possède une corrélation significative de 0.64 (**fig supplémentaire 5**) avec Bite. Cela est logique car le poisson est dans la zone proche quand il effectue une morsure envers le miroir. Malgré les nombreuses corrélations entre PZinterm et LFB avec les autres variables, le choix s'est tout de même porté sur LFB. Finalement, Il a été décidé de ne prendre que les variables RTDM, LFB, Bite et PZeloign qui couvrent donc bien les deux axes principaux de l'ACP.

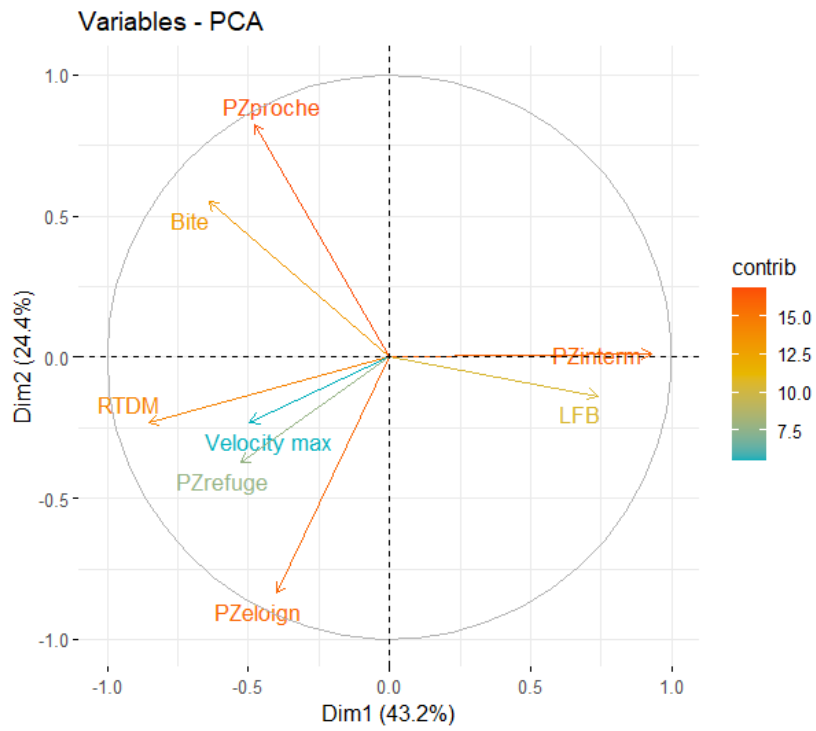


Figure supplémentaire 3 : ACP des variables réponses de l'analyse 1

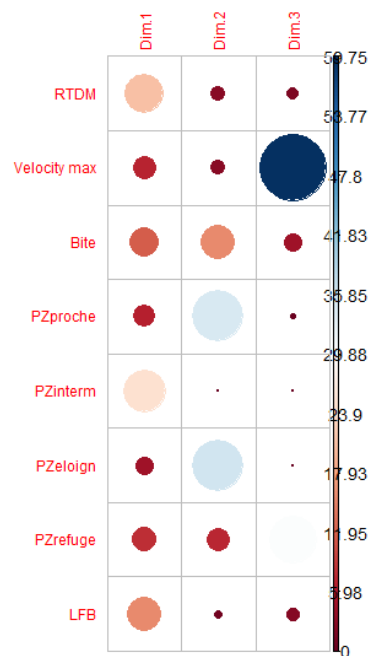


Figure supplémentaire 4 : Contribution des variables de l'ACP selon les 3 premières dimensions.

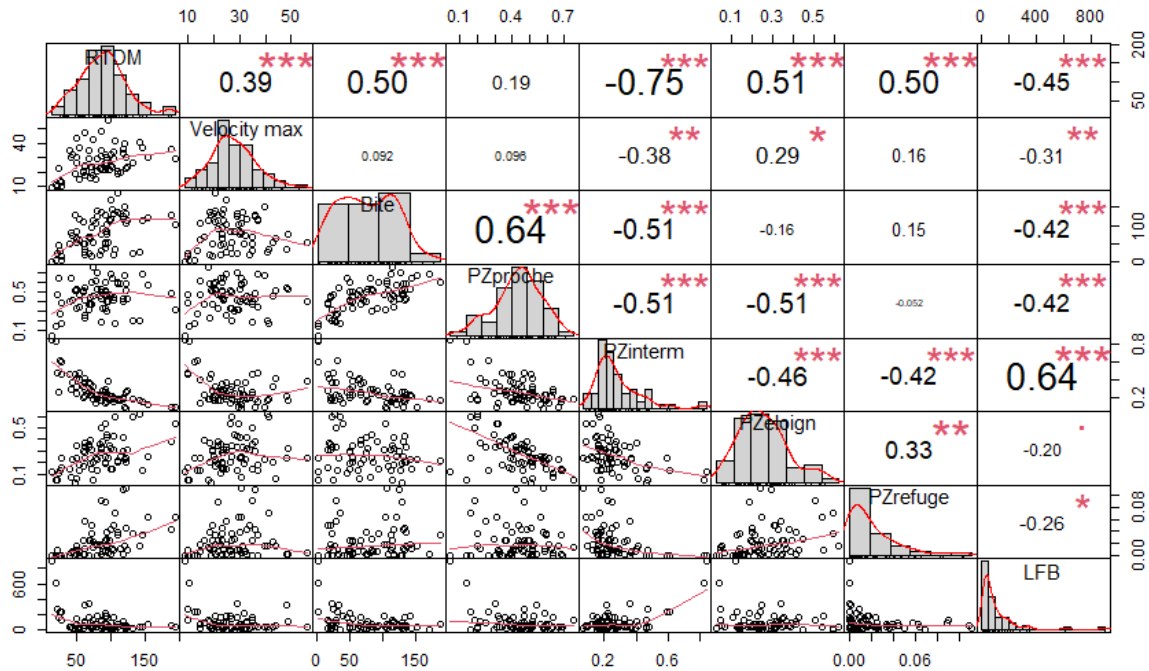


Figure supplémentaire 5 : Carte de corrélation de l'ensemble des variables réponses pour l'analyse 1

Choix des variables explicatives pour l'analyse 2

Le choix des variables explicatives concernant les mesures épigénétiques et d'expression se sont basées en premier lieu sur la disponibilité suffisantes des données. C'est pourquoi dès le début, les gène TLR5, TLR9 ainsi que la partie intragénique de tollip ont été écartés car possédant trop de Na. Il a été décidé de ne garder dès lors que les gènes avec suffisamment de données pour pouvoir faire l'analyse, c'est-à-dire la méthylation de TLR2 (TLR2Meth), TLR7(TLR7Meth), la partie promotrice de Tollip (TollipPMeth) ainsi que les expressions relatives de Tollip (TOLLIPexp) et TLR5 (TLR5exp). Malgré cela, la taille de l'échantillon a dû être réduite à 10 individus pour pouvoir lancer l'analyse.

Concernant les variables explicatives comportementales, une ACP a été réalisée sur les 6 variables à ma disposition. Il en ressort que la température (Temp), la taille, la conductivité, le poids des testicules (PT), l'aire de la nageoire anale (NA), l'aire de la nageoire caudale (NC),

l'aire de la bande jaune (BJ) ainsi que le poids des testicules divisé par le poids du poisson (T/P) contribuent principalement dans les deux premiers axes de l'ACP. Ces deux axes principaux expliquent 60,7% de la variabilité (**fig supplémentaires 6 et 7**). La variable taille ainsi que Sal sont choisies car elles ont une contribution importante pour chacune des dimensions. NA est écarté après ce choix car corrélé à la Taille (0.70). Ensuite BJ et NC sont corrélées à hauteur de 0.95 (**fig supplémentaire 8**). NC est alors choisi car cette variable contribue plus que BJ sur le deuxième axe de l'ACP. PT est corrélé à T/P, mais possède une plus grande contribution que T/P dans la première dimension et est donc retenu. Il a donc été décidé de ne prendre que les variables NC, PT, Taille et Sal. Ce qui fait qu'au final, l'ensemble des variables explicatives pour cette analyse est NC, PT, Taille, température, TLR2Meth, TLR7Meth, TollipPMeth, TOLLIPexp ainsi que TLR5exp.

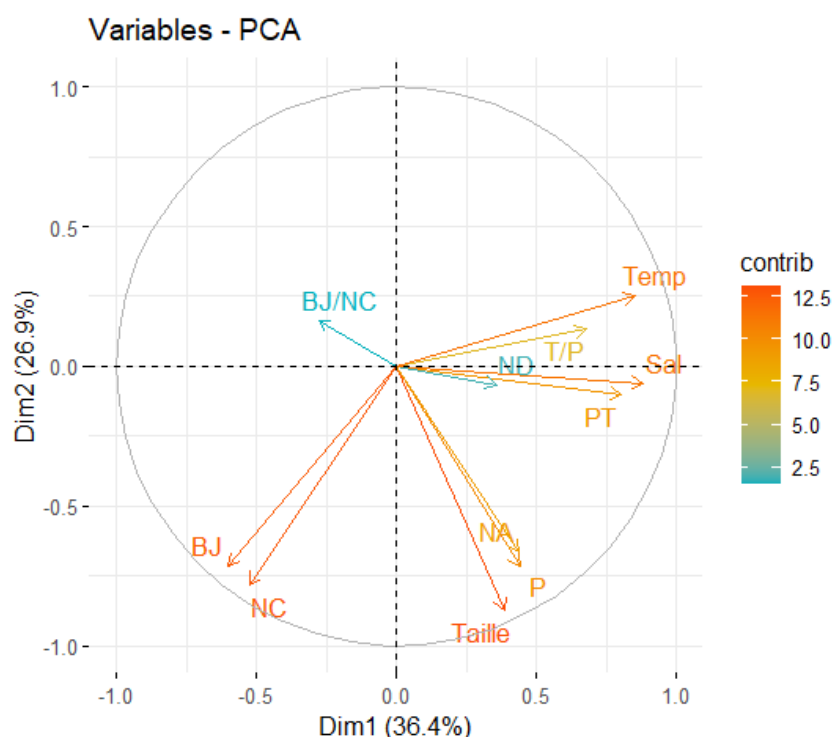


Figure supplémentaire 6 : ACP des variables explicatives de l'analyse 2

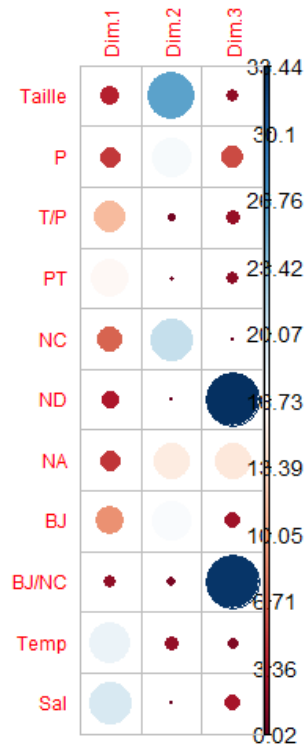


Figure supplémentaire 7 : Contribution des variables de l'ACP selon les 3 premières dimensions.

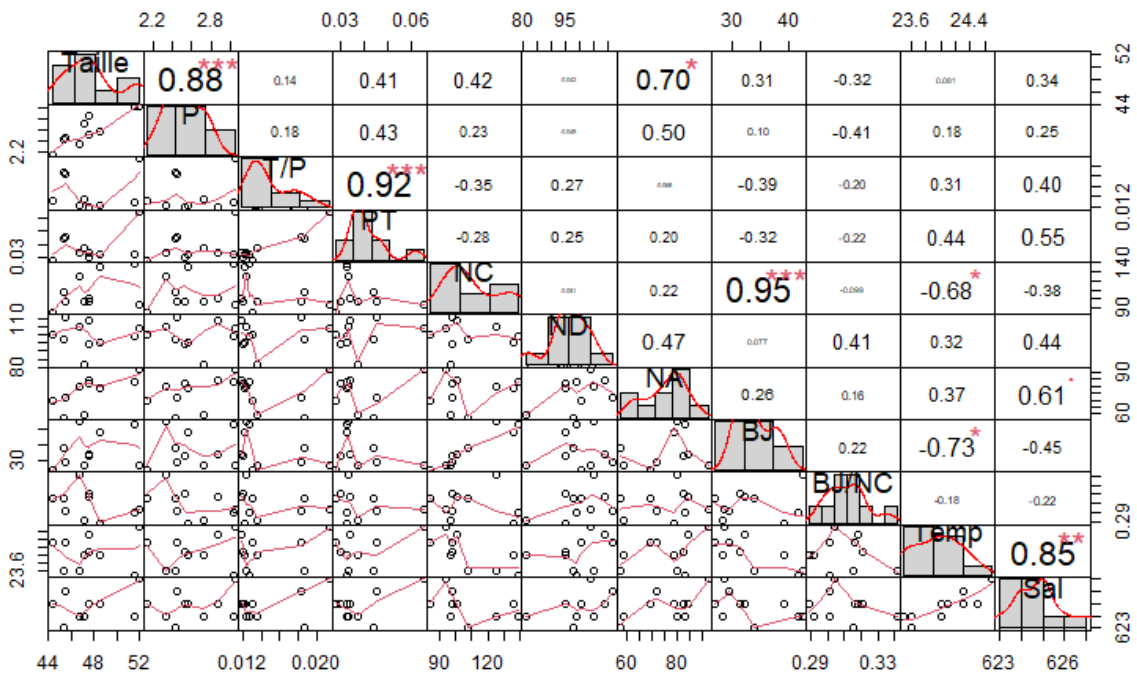


Figure supplémentaire 8 : Carte de corrélation de l'ensemble des variables explicatives (MIA) pour l'analyse 1

Choix des variables réponses pour l'analyse 2

Huit variables réponses sont à nouveau analysées sous ACP pour pouvoir faire un choix sur celles-ci. Les variables qui ont les plus grosses contributions selon les deux premiers axes de l'ACP et qui expliquent donc 82,7% de la variabilité sont : RTDM, Bite, PZinterm, PZeloign, PZproche. Il a été décidé à la vue de l'ACP ci-dessous (**fig supplémentaire 9 et 10**) de ne prendre que les variables PZinterm, Bite, RTDM ainsi que PZeloign. PZproche ayant déjà été écarté auparavant due à une corrélation positive avec les morsures, elle est à nouveau rejetée. La charte des corrélations de ces variables est disponible à la **figure supplémentaire 11**.

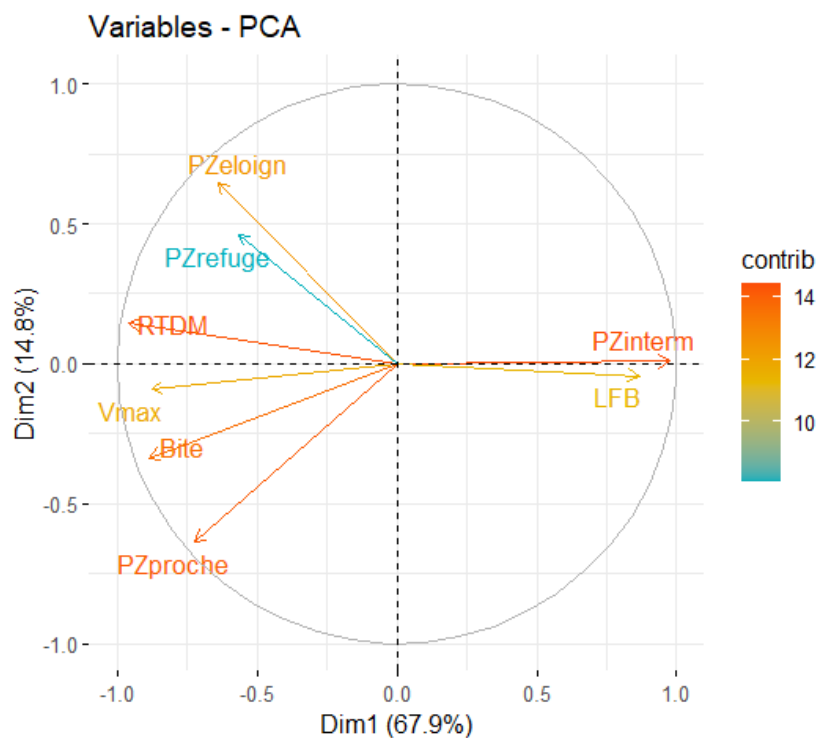


Figure supplémentaire 9 : ACP des variables réponses de l'analyse 2

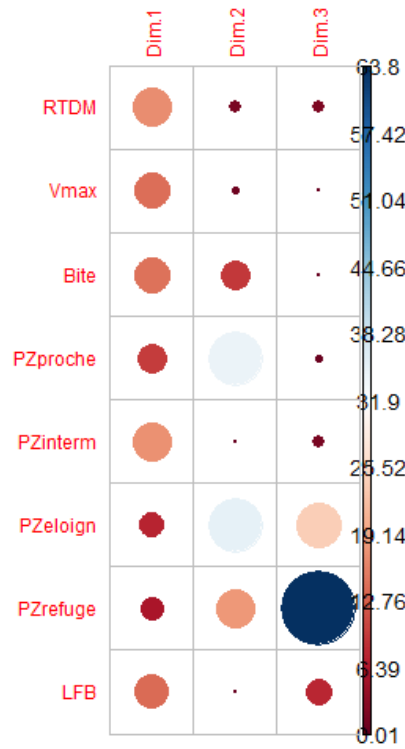


Figure supplémentaire 10 : Contribution des variables de l'ACP selon les 3 premières dimensions.

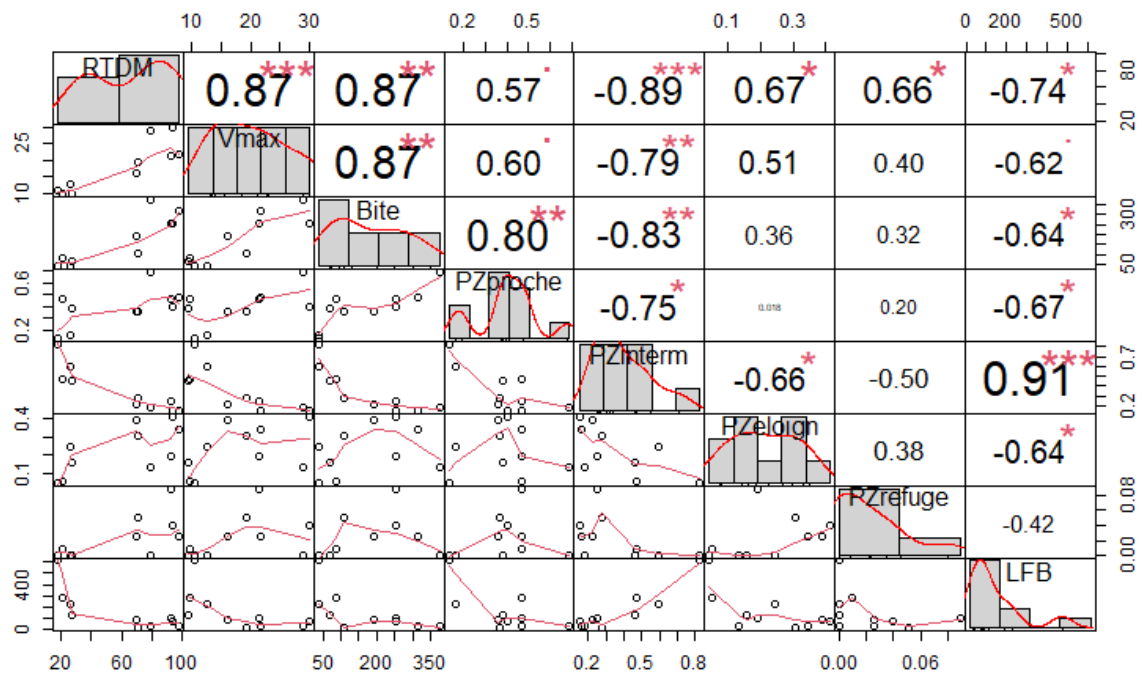


Figure supplémentaire 11 : Carte de corrélation de l'ensemble des variables explicatives (MIA) pour l'analyse 1

Annexe 5 : Structures des modèles et transformations des variables

<u>Variable Analyse 1</u>	Test	Modèle	Transformation
Morsures	MIA	mnb14 <- glmer.nb(Bite~timepoint+(1 Fishnumber), data=test3, control=glmerControl(optimizer="bobyqa"))	Log(glm)
Latence avant la première morsure	MIA	M34B <- lmer(LFB~timepoint+(1 Fishnumber), data=test3, REML=T)	Log
Temps passé en zone éloignée	MIA	M7A <- lmer(PZeloign~timepoint+Temp+Sal+(1 Fishnumber), data=test3, REML=T)	orderNorm
RTDM	MIA	M5 <- lmer(RTDM~timepoint+(1 Fishnumber), data=test3, REML=T)	/
<u>Variable Analyse 2</u>			
Temps passé en zone intermédiaire	MIA	Mod4B <- lm(PZinterm~NC+Sal+PT+Taille+TOLLIPexp+TLR5exp+TLR7Meth, data=testFinale)	orderNorm
Morsures	MIA	Mod23B <- glm(Bite~NC+Sal+PT+TOLLIPexp+TLR7Meth+TLR2Meth+TollipPMeth, data=testFinale, family = "poisson")	Log(glm)
Temps passé en zone éloignée	MIA	Mod4B <- lm(PZeloign~NC+Sal+PT+TOLLIPexp+TLR5exp+TLR7Meth+TollipPMeth, data=testFinale)	/
RTDM	MIA	Mod11B <- lm(RTDM~Taille+NC+Sal+PT+TOLLIPexp+TLR7Meth+TLR2Meth, data=testFinale)	orderNorm

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté des sciences

Place des sciences, 2 bte L6.06.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/sc