Sommaire

LISTE DES ABREVATIONS **1**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **3**

INTRODUCTION **9**

AVANT-PROPOS 10

I) LE VIEILLISSEMENT: OU EN SOMMES-NOUS ? **12**
1) Comment définit-on le vieillissement ? 12
2) Vieillir: un processus universel 14
a) Les indicateurs de mesure de vieillissement *14*
b) Le vieillissement de la population mondiale *15*
3) Le vieillissement chez l'Homme 17
a) Quels enjeux ? *17*
b) Les bio-marqueurs du vieillissement *18*
c) Un vieillissement, des vieillissements *19*

II) ETUDIER LE VIEILLISSEMENT **21**
1) Les théories du vieillissement 21
a) Les théories évolutionnistes 22
b) Les théories déterministes 22
c) Les théories stochastiques 23
2) Les différents types d'étude du vieillissement 25
a) Les études longitudinales 25
b) Les études de cohortes 26
c) Les études transversales 26
d) Les études comparatives 26
3) Les modèles d'étude expérimentaux 27
a) Les unicellulaires 27
b) Les invertébrés 29
c) Les poissons 31
d) Les rongeurs 33
e) Les oiseaux 35
f) Les primates non-humains 36

III) LUTTER CONTRE LE VIEILLISSEMENT **39**
1) Dans quel contexte ? 39
2) Les protocoles anti-vieillissement 40
a) Les interventions génétiques 40
b) L'exposition à des stress modérés : la théorie de l'Hormesis 41
c) L'activité physique 42

d) L'hormonothérapie 44
e) Les interventions nutritionnelles 45

IV) LA RESTRICTION CALORIQUE 47
1) Effets physiologiques de la restriction calorique chez différentes espèces 48
a) Chez les invertébrés 48
b) Chez les rongeurs 50
c) Chez les primates non-humains 52
d) Chez l'Homme 54
2) Certaines limites à l'utilisation de la restriction calorique 55

V) MIMER LES EFFETS DE LA RESTRICTION CALORIQUE 56
1) Les mimétiques de la restriction calorique: définition et exemples 57
a) La metformine 57
b) L'AMPK 58
c) La rapamycine 58
d) La spermidine 59
2) Le resvératrol, composé phénolique naturel 59
3) Effets physiologiques du resvératrol chez différentes espèces 61

MODELE D'ETUDE 66

I) PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : LE MICROCEBE MURIN 67
1) Phylogénie et classification 67
2) Caractéristiques morphologiques 68
3) Distribution et habitat naturel 70
4) Alimentation et reproduction 71
5) Rythmes saisonniers 73
6) Rythme circadien : activité locomotrice et température corporelle 74

II) LE MICROCEBE : UN MODELE D'ETUDE DU VIEILLISSEMENT 76
1) Caractéristiques morphologiques du vieillissement 76
2) Longévité et survie 77
3) Balance énergétique et vieillissement 78
4) Fonctions hormonales et vieillissement 79
a) Les hormones sexuelles 79
b) Les hormones de croissance 79
c) Les hormones thyroïdiennes 80
d) Les hormones stéroïdiennes 80
5) Rythmes biologiques et vieillissement 81
a) Le rythme saisonnier 81
b) Le rythme journalier 83
6) Thermorégulation et vieillissement 85
7) Fonctions sensorielles et vieillissement 86

a) La vision 87
b) L'olfaction 87
8) Performances motrices et vieillissement 88
9) Performances cognitives et vieillissement 89
a) La discrimination 89
b) La mémoire de reconnaissance 90
c) La mémoire spatiale de travail 91
d) La mémoire spatiale de référence 91
e) Les fonctions exécutives 92
10) Altérations cérébrales et neuropathies 93

DEMARCHE EXPERIMENTALE 98

I) LE PROJET RESTRIKAL : CONTEXTE D'ETUDE 99
1) Elevage et conditions de captivité 100
2) Démarche expérimentale 101
II) BILAN DES RESULTATS PUBLIES DU PROJET RESTRIKAL 104
1) Réponses adaptatives aux traitements à court terme 104
2) Evolution des performances cognitives et motrices à court et moyen terme 104

OBJECTIFS ET ATTENTES 106

CHAPITRES 111

CHAPITRE I: IMPACT D'UNE RESTRICTION CALORIQUE OU D'UN APPORT EN RESVERATROL SUR LES PERTURBATIONS METABOLIQUES ASSOCIEES A L'AGE 112

Objectifs – Chapitre I 113

Etude 1 : Impact de la restriction calorique ou d'une supplémentation alimentaire en resvératrol sur les marqueurs de la sensibilité à l'insuline chez le microcèbe 114
Etude 2 : Evaluation des dommages du matériel génétique chez le microcèbe : impact d'une restriction calorique ou du resvératrol sur les marqueurs urinaires du stress oxydant cellulaire 125
Etude 3 : Fonctions hépatiques et protocoles anti-âge : effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol chez un primate non-humain 152

Conclusion – Chapitre I 163

CHAPITRE II: IMPACT DES PROTOCOLES ANTI-AGE SUR LE VIEILLISSEMENT CEREBRAL 165

Objectifs – Chapitre II 166

Etude 4 : Capacités mnésiques et comportement d'exploration chez le microcèbe : impact d'interventions anti-âge 167
Etude 5 : Effets d'une restriction calorique modérée ou d'une supplémentation en resvératrol sur les performances motrices et sur les traits comportementaux spontanés chez le microcèbe 195
Etude 6 : Atrophie cérébrale au cours de l'âge chronologique : imagerie cérébrale chez le microcèbe 223

Conclusion – Chapitre II 232

CHAPITRE III: STRATEGIES ANTI-AGE : EVOLUTION DES MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT ET DONNEES DE SURVIE 235

Objectifs – Chapitre III 236

Etude 7 : Etude longitudinale chez le microcèbe : impact d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur l'évolution des marqueurs du vieillissement 237
Etude 8 : Effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur le profil ante-mortem et sur la mortalité chez le microcèbe 267

Conclusion – Chapitre III 276

DISCUSSION 277

SYNTHESE ET DISCUSSION 278

I) BILAN DES RESULTATS OBTENUS 279
1) Adaptation aux différents traitements 280
2) Résumé des principaux résultats 281

II) IMPACT DE LA RESTRICTION CALORIQUE 284
1) Effet sur les marqueurs du vieillissement 284
2) Retard d'apparition d'altérations physiologiques associées à l'âge et survie 288

III) LE RESVERATROL : MIMETIQUE DE LA RC CHEZ CE PRIMATE ? 290
1) L'action mimétique du résveratrol : oui… 290
2) …et non. Les différences observées 291
3) Vers une harmonisation des mécanismes 296
a) L'activation des sirtuines 296
b) La biogénèse mitochondriale 298
c) La théorie de l'Hormésis 298

IV) LES LIMITES DE L'ETUDE 300

1) Le suivi longitudinal 300
2) Pertinence de la RC et du RSV chez le microcèbe 301

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 303
1) QUESTIONS EN SUSPEND 303
2) Perspectives et application(s) potentielle(s) à l'Homme 304

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 309

ANNEXES 333
ANNEXE A: ARTICLES RELATIFS AU SUJET DE THESE 334
ANNEXE B: DESCRIPTION DES DISPOSITIFS ET METHODES UTILISES POUR L'EVALUATION DES PERFORMANCES COGNITIVES ET MOTRICES ET DU COMPORTEMENT CHEZ LE MICROCEBE 374
ANNEXE C: PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR IRM ET ANALYSES DES IMAGES PAR ANATOMIST ..... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**81
ANNEXE D: SUIVI DE LA TEMPERATURE CORPORELLE DU MICROCEBE PAR THERMOGRAPHIE INFRAROUGE 387
ANNEXE E : ANALYSE DE LA BIODISPONIBILITE ET DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE DU RESVERATROL 389

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Liste des abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique
AGE = advanced glycation end-product
ALB = albumine
ALP = alcaline phosphatase
ALT = alanine transaminase
ARN = acide rybonucléique
ARNmt = acide rybonucléique mitochondrial
AMP = adenosine monophosphate
AMPK = adenosine monophosphate-activated protein kinase
ATP = adenosine triphosphate
AUC = area under curve
AVP = arginine vasopressin

BLSA = Baltimore longitudinal study of aging
BM = body mass (*masse corporelle*)
BUN = blood urea nitrogen

CHICO = insulin receptor substrate-1
CHOL = cholesterol total
CI = calories ingested (*calories ingérées*)
CLOCK = circadian locomotor output cycles kaput
COX = cytochrome C oxydase
CP = circular plateform (*plate-forme circulaire ou labyrinthe de Barnes*)
CPP = conditionned place preference (*préférence conditionnée pour un emplacement*)
CR = calorie restricted (*restriction calorique*)
CSA = continuous spontaneous alternation (*alternance spontanée*)
CTL = control (contrôle)

DEE = daily energy expenditure (*dépenses énergétiques journalières*)
DHEA = déhydroépiandrostérone

ENSO = El Niño–Southern Oscillation
EVSI = espérance de vie sans incapacité

FFM = fat free mass (*masse maigre*)
FM = fat mass (*masse grasse*)
FOXO = forkhead box O protein
FRTA = free radical theory of aging

GH = growth hormone (*hormone de croissance*)
ɣGT = gamma glutamyl transpeptidase

HDL = high-density lipoprotein
HGPO = hyperglycémie provoquée orale
HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance
HSP = heat shock protein

IGF-1 = insulin-like growth factor type 1
INSEE = institut national de la statistique et des études économiques
ILs = interleukins
IRM = imagerie par résonance magnétique

JC = jours courts (saison)
JL = jours longs (saison)

LD = long day period (season)
LDL = low-density lipoprotein

mTOR = mammalian target of rapamycin

NAD = nicotinamide adénine dinucléotide
NIA = national institute of aging
NIH = national institute of health

OF = open field (*test en champ ouvert*)
OGTT = oral glucose tolerance test
OMS = organization mondiale de la santé
ONU = organisation des nations unies

PGC-1α = peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1α γ
PNH = primate non-humain

RC = restriction calorique
RMR = resting metabolic rate (*taux métabolique de repos*)
ROS = reactive oxygen species (*espèces réactives à l'oxygène*)
RSV = resveratrol (*resvératrol*)

SAM = senescence-accelerated mouse
SD = short day period (season)
S-DHEA = déhydroépiandrostérone sulfate
SEM = standard error of the mean (*erreur standard à la moyenne*)
Sir2 = silent information regulator 2 gene
SIRT (1-7) = silent mating type information regulation 2 homolog type (1-7) protein
SOD = superoxide dismutase

Ta = température ambiante
Tc = température corporelle
TBIL = bilirubine totale
TEE = total energy expenditure
TG= triglyceride
TNF-α = tumor necrosis factor-α

UV = ultra-violet

VIP = vasoactive intestinal peptide
WTO = water turn-over

Rapport-Gratuit.com

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1. La fontaine de Jouvence **-- p 10**

Figure 2. Schématisation de l'évolution des fonctions de l'organisme avec l'âge **– p 12**

Figure 3. Schématisation du déclin des fonctions de l'organisme à partir de 30 ans **– p 13**

Figure 4. Changements dans les proportions de la population mondiale **– p 16**

Figure 5. Pyramide des âges chez les hommes et les femmes de la population française **– p 17**

Figure 6. Schéma de l'évolution des capacités des fonctions de l'organisme selon les trois types de vieillissement **– p 19**

Figure 7. Modèles unicellulaires des études du vieillissement **– p 28**

Figure 8. Modèles invertébrés des études du vieillissement **– p 30**

Figure 9. Modèles vertébrés poissons des études du vieillissement **– p 32**

Figure 10. Modèles vertébrés rongeurs des études du vieillissement **– p 34**

Figure 11. Les primates non humains utilisés pour les études du vieillissement **– p 37**

Figure 12. Courbe de l'Hormésis **– p 42**

Figure 13. Schéma des effets bénéfiques hormétiques selon la théorie de Goto et Radak **– p 43**

Figure 14. Restriction calorique et survie chez la souris **– p 47**

Figure 15. Restriction calorique et survie chez le macaque rhésus **– p 52**

Figure 16. Restriction calorique et pathologies chez le macaque rhésus **– p 53**

Figure 17. Structure chimique du resvératrol **– p 60**

Figure 18. L'effet pléiotropique du resvératrol **– p 62**

Figure 19. Bilan **– p 65**

Modèle d'étude

Figure 1. Evolution de la phylogénie des strepsirhiniens entre 1995 et 2011 **– p 68**

Figure 2. Le microcèbe (*Microcebus murinus*) et ses caractéristiques morphologiques **– p 69**

Figure 3. Schématisation de l'aire de répartition du microcèbe et des différents habitats **– p 70**

Figure 4. Caractères morphologiques de la saisonnalité chez le microcèbe **– p 74**

Figure 5. Représentation du rythme circadien de la température corporelle et de l'activité locomotrice spontanée d'un microcèbe exposé à une photopériode de jours courts – **p 75**

Figure 6. Photographie représentative d'un microcèbe adulte (5 ans) et d'un microcèbe âgé (>6 ans) – **p 76**

Figure 7. Courbe de survie établie pour 643 microcèbes de la colonie de Brunoy – **p 77**

Figure 8. Variations saisonnières de la masse corporelle et du métabolisme de repos en fonction de l'âge du microcèbe – **p 78**

Figure 9. Représentation graphique des rythmes d'activité locomotrice chez un microcèbe adulte, un microcèbe âgé, et un microcèbe adulte ayant subi une alternance accélérée des saisons depuis sa naissance – **p 82**

Figure 10. Variation des taux de 6-sulfatoxymélatonine urinaire chez des microcèbes adultes et âgés – **p 84**

Figure 11. Endurance au rotarod chez des microcèbes jeunes (<3 ans), adultes (3-4 ans) et âgés (>6ans) exposés à des jours courts (A) ou à des jours longs (B) – **p 88**

Figure 12. Profils coronaux (A-C) et horizontaux (B-D) de cerveaux de microcèbe réalisé par acquisition IRM in vivo – **p 94**

Figure 13. Régressions linaires montrant la relation entre les performances cognitives et l'atrophie cérébrale de structures spécifiques chez le microcèbe âgé – **p 95**

Figure 14. Similitudes dans l'évolution de marqueurs biologiques du vieillissement chez l'Homme et chez le microcèbe – **p 97**

Démarche expérimentale

Figure 1. Schéma de la démarche expérimentale représentant le suivi longitudinal du projet RESTRIKAL – **p 101**

Figure 2. Représentation chronologique des expériences pour une année « type » du projet RESTRIKAL – **p 102**

Figure 3. Représentation décroissante de la fréquence de chaque expérience menée au cours du projet RESTRIKAL (fréquence par saison et fréquence annuelle) – **p 103**

Chapitre I – Etude 1

Figure 1. Body mass at oral glucose tolerance test in control (CTL), calorie restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) animals after 21 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 6) and after 33 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 8) **– p 119**

Figure 2. Plasma glucose concentrations and area under curves (AUC) during oral glucose tolerance test in control (CTL), calorie restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) animals **– p 120**

Table 1. Sample size, fasting plasma levels of insulin and HOMA-IR obtained during the OGTT after 21 months of treatment or after 33 months of treatment **– p 121**

Table 2. Table of simple linear regressions in CTL, CR and RSV animals **– p 122**

Chapitre I – Etude 2

Table 1. Characteristics of studied mouse lemurs **– p 133**

Table 2. The mass spectrometers acquisition parameters (150ms dwell time) **– p 135**

Table 3. Values of energy balance parameters in mouse lemurs **– p 138**

Table 4. Linear mixed model effect analysis on energy balance parameters **– p 138**

Table 5. Linear mixed model effect analysis of oxidized nucleosides **– p 140**

Figure 1. Evolution of oxidative stress markers across seasons and years of treatment **– p 141**

Table 6. Simple linear regression of oxidized nucleosides levels with chronological age **– p 142**

Chapitre I – Etude 3

Figure 1. Masse corporelle en fonction du traitement (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : resvératrol), de la saison (SD ou LD) et de l'année de traitement (année 3 ou année 4) **– p 155**

Figure 2. Concentrations de bilirubine totale (TBIL) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC/JL) **– p 155**

Figure 3. Concentrations d'acide biliaire (BA) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et des années de traitement **-- p 156**

Figure 4. Concentrations de cholestérol total (CHOL) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol), de la saison (JC/JL et de l'année de traitement) **-- p 156**

Figure 5. Concentrations en phosphatase alcaline (ALP) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC ou JL) **– p 157**

Figure 6. Concentrations d'alanine aminotransférase (ALT) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC ou JL) **-- p 158**

Tableau 1. Résumé des principaux résultats de l'étude sur les marqueurs biochimiques du métabolisme hépatique en fonction des traitements (CTL vs RC ou CTL vs RSV), de la saison (JC vs JL) et de l'année de traitement (3ème vs 4ème année) **-- p 159**

Chapitre II – Etude 4

Table 1. Description of groups used for each behavioral session **– p 175**

Figure 1. Estimated values of number of visits (A) and of percentage of alternation (B) during the continuous spontaneous alternation task **-- p 180**

Figure 2. Estimated values of error's number before reaching the goal box in the circular patform task **– p 181**

Figure 3. Estimated values of latency before the first movement and of the total activity recorded during the open-field task **– p 182**

Table 2. Anova analysis of generalized linear mixed model of behavioral measures **– p 183**

Table 3. Parameter estimates and analysis information for the generalized linear mixed model selected from Tables 2 to predict behavioral measures **– p 184**

Chapitre II – Etude 5

Table 1. Description of groups used for jump and rotarod tasks sessions **– p 203**

Figure 1. Effects of long-term CR and RSV diets on detente in a jump task **– p 207**

Figure 2. Effects of long-term CR and RSV diets on endurance in an accelerated rotarod task **– p 208**

Figure 3. Effects of long-term CR and RSV diets on anxiety in a non elevated plus-maze **– p 209**

Figure 4. Effects of long-term CR and RSV diets on physical activity in home-cage during long-day and short-day photoperiods **– p 210**

Table 2. Number of animals which expressed food-related behaviors and stereotypies during the long-day (LD) and short-day (SD) photoperiods – **p 211**
Figure 5. Effects of long-term CR and RSV diets on aggressive behaviors – **p 212**

Chapitre II – Etude 6

Figure 1. Exemples de délimitation du noyau caudé (A), de la région septale (B), de l'hippocampe (C), du thalamus (D), du cortex entorhinal (E) et du cortex temporal (F) sur des images IRM coronales – **p 226**
Figure 2. Boites de dispersion (Médiane, 1 et 3ème quartiles) des volumes (ajustés pour le volume intracérébral) des ROIs – **p 228**
Figure 3. Régression linéaire simple entre le volume de l'hippocampe (ajusté pour le volume intracérébral) et l'âge chronologique en mois – **p 229**
Figure 4. Régression linéaire simple entre l'épaisseur du cortex cingulaire et l'âge chronologique en mois – **p 230**

Chapitre III – Etude 7

Figure 1s. Morphologie du microcèbe âgé de 8 ans appartenant au groupe CTL (A et B) ; appartenant au groupe RC (C et D) ou appartenant au groupe RSV (E et F). (Photos, Eric Gueton et Julia Marchal, 2012) – **p 239**
Figure 1. Mean ingested calories (kJ/day) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) – **p 249**
Figure 2. Mean body mass (g) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod) – **p 250**
Figure 3. Resting metabolic rate (RMR), brut (mLO_2/min) or adjusted for body mass variation, in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (b: beginning; e: end of season; SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod) – **p 251**
Figure 4. Spontaneous physical activity during the night and during the day (arbitrary unit), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod) – **p 252**

Figure 5. Plasma IGF-1 levels (ng/mL), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons – **p 253**
Figure 6. Plasma testosterone levels (ng/mL), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons – **p 254**
Figure 7. Urinary cortisol levels (ng/mL; adjusted for creatinine variations), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons – **p 256**
Figure 8. Survival rate (%) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to chronological age – **p 256**

Chapitre III – Etude 8

Figure 1. Evolution des taux de mortalité en fonction de l'âge chronologique (en mois), pour chaque groupe d'animaux – **p 269**
Figure 2. Age moyen à la mort (en mois) pour chaque groupe d'animaux – **p 270**
Figure 3. Causes de la mort pour chaque groupe d'animaux – **p 271**
Figure 4. Représentations chronologiques des causes de la mort pour chaque groupe d'animaux – **p 272**
Figure 5. Evolution de la diurèse (en mL) pour chaque groupe d'animaux – **p 273**

Discussion

Figure 1. Evolution des publications (articles et revues) de 1935 à aujourd'hui concernant la restriction calorique, le resvératrol et les interventions nutritionnelles anti-âge. (Source Pubmed 2012) – **p 280**
Tableau 1. Résumé des résultats principaux des travaux de thèse – **p 283**
Figure 2. Bilan comparatif des effets d'une restriction calorique ou d'un apport en resvératrol à moyen et à long terme chez le microcèbe – **p 295**
Figure 3. Représentation schématique de la relation entre le resvératrol, SIRT1, cancer, vieillissement et longévité, étudiée chez plusieurs organismes – **p 297**
Figure 4. Représentation schématique de la théorie de l'Hormésis : relation entre les facteurs nutritionnels et les fonctions de l'organisme (Adapté de Mattson, 2008) – **p 299**
Tableau 2. Recommandations pour l'utilisation du resvératrol chez l'Homme – **p 306**

Introduction

Avant-propos

Parce que le vieillissement est un phénomène qui n'épargne rien ni personne, nous nous sentons aussi familiers et inséparables de ce processus que perplexes et imaginatifs à son sujet. Mystérieux et complexe, le vieillissement « touche à tout » et fascine l'Homme depuis des millénaires. Alimentant mythes, légendes et ouvrages antiques, plusieurs hommes se sont prêtés à l'exercice : comprendre le vieillissement au travers d'affabulations et de la recherche de vérité (Figure 1, le mythe de la Fontaine de Jouvence). Mais sa problématique ne se comprend véritablement qu'en examinant chacune de ses dimensions : individuelle, collective, sociétale et culturelle. Bien que les réponses aux questions relatives à la vie et à la mort que nous nous posons dépassent largement l'unique domaine de la biologie, le vieillissement semble impossible à dissocier du fil de nos vies.

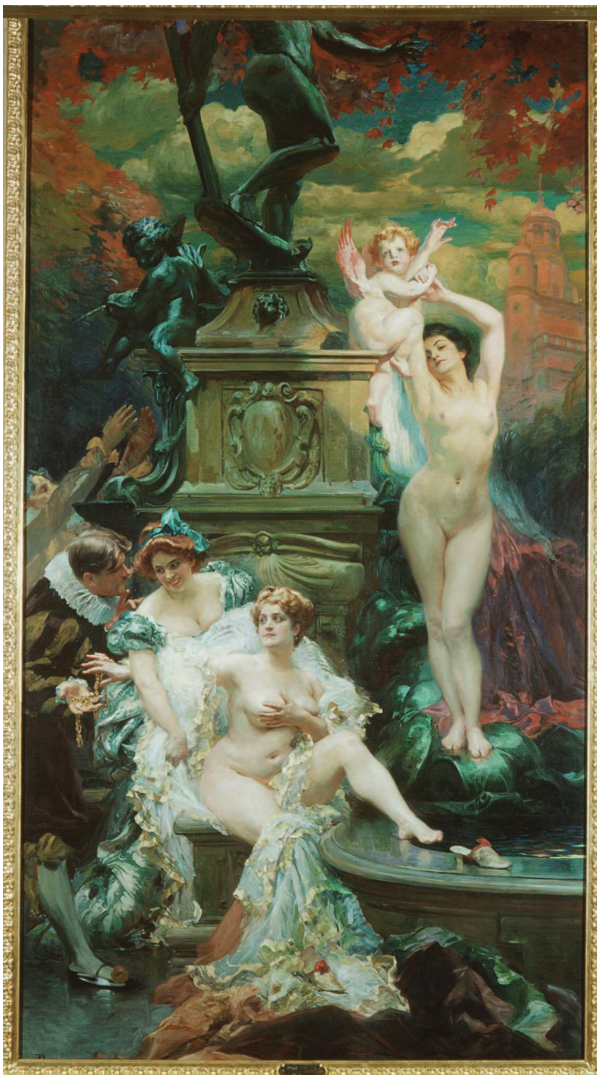


Figure 1. La Fontaine de Jouvence

« Peinture représentant le mythe de « la Fontaine de Jouvence ». Réalisée en 1908 par Paul Jean Gervais (1859-1936), peintre d'histoire, de sujets allégoriques et de scènes mythologiques. Cette toile est détenue au Capitole de Toulouse dans la salle des Illustres. On y voit trois femmes venues retrouver leur « jeunesse » en s'abreuvant et se baignant dans l'eau pure de la Fontaine de Jouvence, surplombée de statues de bronze, représentant l'Amour (Cupidon, fils de Mars et de Vénus) et Mars, dieu de la Guerre et de l'Agriculture, mais aussi dieu du Printemps et de la Jeunesse.

Source :http://www.jacobins.mairie toulouse.fr/patrhist/edifices/textes/capitole/Paul_Jean_ Gervais.

Ainsi, alors que nous connaissons une période d'apogée après la jeunesse, notre organisme se laisse aller sur la douce pente du temps sans pouvoir reculer ou s'accrocher pour un peu arrêter le temps qui file… « Arrêter », « reculer le temps », ce sont bien là les attentes pressées ou inavouées de nos sociétés occidentales. Parce que le vieillissement s'accompagne souvent d'un déclin des fonctions vitales de l'organisme, du développement de pathologies chroniques liées à l'âge et d'une perte d'autonomie, nous voulons bien vieillir mais pourvu que nous restions en possession de toute notre vigueur, de notre bonne santé et de toute notre tête !

Alors que le rêve d'une jeunesse éternelle est palpable au travers de l'utilisation des artifices de la cosmétique et de la chirurgie esthétique, les mécanismes sous-jacents au vieillissement, plus capricieux, nous ouvrent petit à petit leur porte. Il parait encore loin ce jour où chacun pourra faire machine arrière, remontant ou arrêtant l'horloge de sa vie. Mais c'est bien grâce aux nombreuses études de la Recherche sur le vieillissement et grâce au développement de nouveaux modèles expérimentaux que les indices s'accumulent pour compléter le schéma « multi-factoriel » de ce phénomène, beau présage dans le domaine de recherche d'élixir anti-âge, car une meilleure connaissance des mécanismes du vieillissement permet aujourd'hui d'envisager des stratégies susceptibles de prévenir certains effets néfastes du vieillissement et ce peut-être pour demain...

I) Le vieillissement: où en sommes-nous ?

1) Comment définit-on le vieillissement ?

Le vieillissement peut être défini par certains auteurs comme « l'action du temps sur les êtres vivants » (Blain et Jeandel, 2003). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une personne entre dans la vieillesse à partir de 65 ans. Sur le plan social, la vieillesse correspond souvent à l'âge de cessation d'activité professionnelle (entre 55 et 65 ans). Selon une dimension plus biologique, le vieillissement est un processus complexe caractérisé par plusieurs éléments: des changements physiologiques et/ou psychologiques qui conduisent généralement à un déclin fonctionnel de l'organisme avec l'âge, une augmentation de la sensibilité à certaines maladies avec l'âge et une augmentation exponentielle de la mortalité avec l'âge. Le vieillissement peut donc être défini comme une détérioration progressive des fonctions de l'organisme (physiologiques, cérébrales, comportementales…), processus accompagné d'une perte de viabilité des fonctions vitales et d'une augmentation de la vulnérabilité (Figure 2).

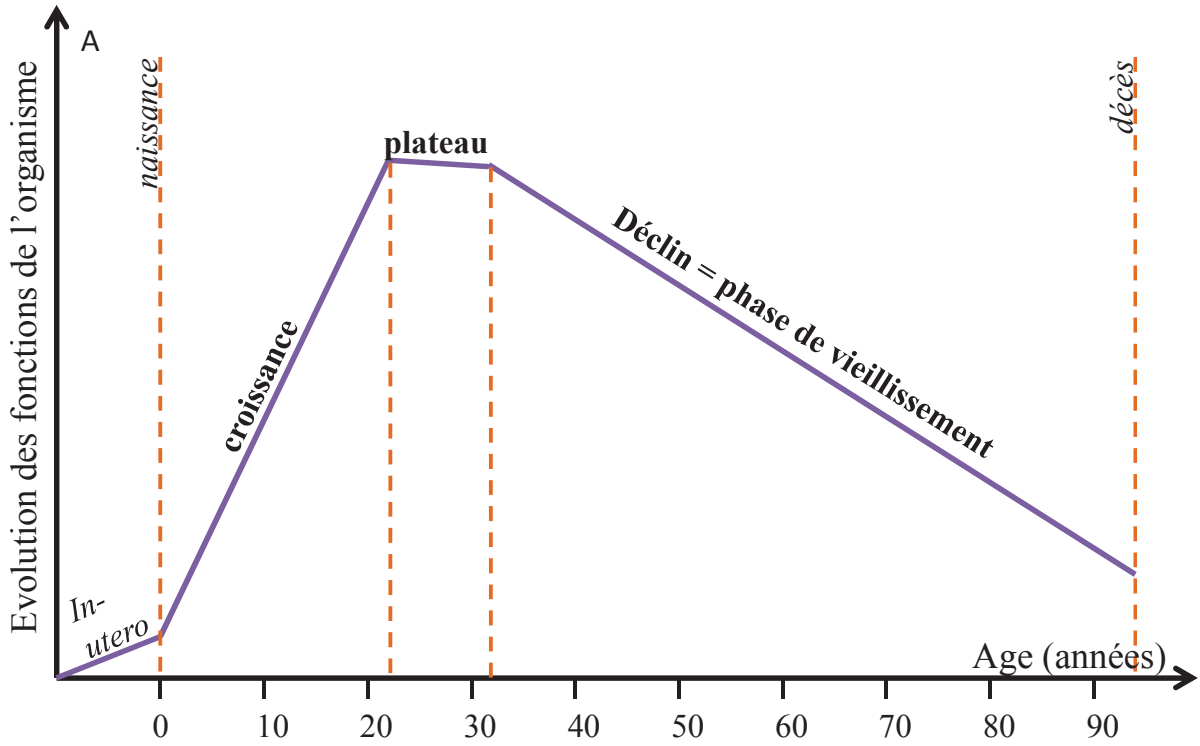


Figure 2. *Schématisation de l'évolution des fonctions de l'organisme avec l'âge. Les fonctions de l'organisme croissent pendant les périodes de développement prénatal et*

postnatal, jusqu'à l'âge de 20 ans environ, âge auquel elles atteignent un plateau correspondant à une période de capacités maximales. Puis ces capacités déclinent avec l'âge jusqu'à la mort de l'individu.

Cependant, un certain nombre des fonctions de l'organisme ont été mesurées chez l'Homme au cours de l'âge, et plusieurs études comparatives montrent une différence dans la vitesse de vieillissement. Nathan William Shock a d'ailleurs été le premier gérontologue à étudier et comparer certaines fonctions de l'organisme au cours du vieillissement. La figure 3 montre d'une façon schématique les résultats d'une partie de ses études menées au National Institut of Health (NIH, Maryland, USA), montrant qu'il existe de grandes différences entre les vitesses de déclins des différentes fonctions « vitales » au cours du temps (voir pour revue, Shock et al., 1984). Les déclins les plus rapides concernent les organes respiratoires et circulatoires, notamment les vaisseaux sanguins et le cœur qui sont des organes riches en matrice extracellulaire et en particulier en tissu élastique (élastine). En effet, la quantité d'air maximale emmagasinée par les poumons lors d'une inspiration profonde et la vitesse de circulation du sang dans les artères sont affectées précocement. Au contraire, la baisse de la vitesse de la conduction nerveuse est très lente, suivie de près par celle du métabolisme de base (mesuré par la consommation d'oxygène d'une personne au repos) (Figure 3).

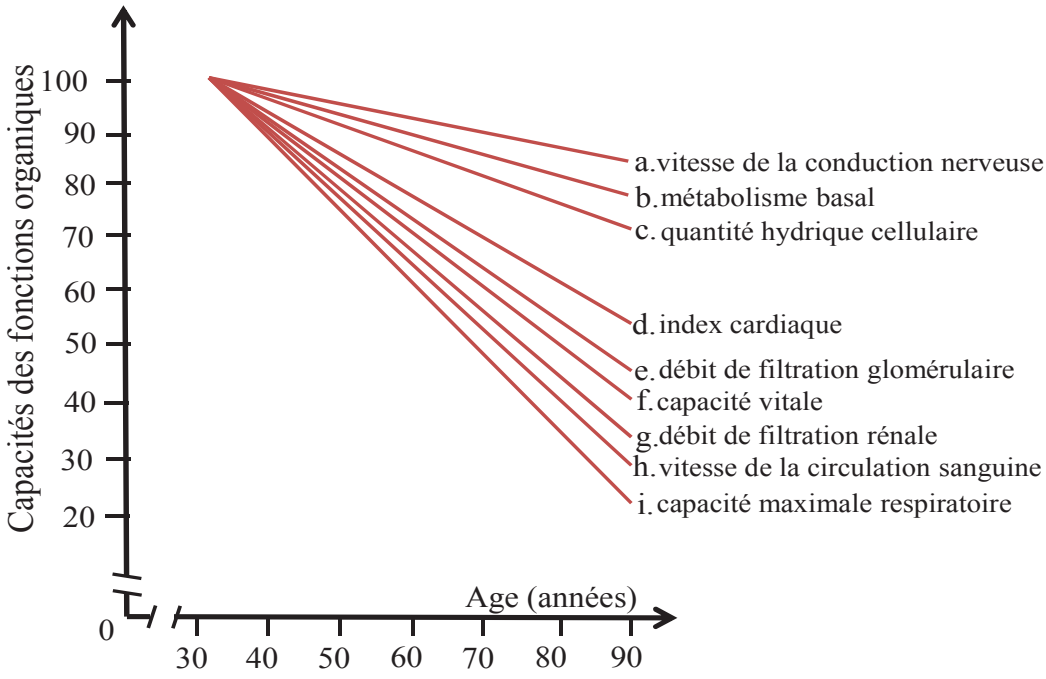


Figure 3. *Schématisation du déclin des fonctions de l'organisme à partir de l'âge de 30 ans. Index cardiaque : quantité de sang expulsé par chacun des ventricules du cœur, par minute et*

par mètre carré de surface corporelle ; débit de filtration glomérulaire :le volume de liquide filtré par le rein par unité de temps. (Adaptée de Physical activity and the « rate of ageing », N.W Shock., 1967).

2) Vieillir: un processus universel

Véritable problème de santé publique et de société, ayant des répercussions sociales, économiques et politiques, le vieillissement n'épargne personne, ainsi le nombre des personnes âgées dans le monde (de 60 ans et plus) va continuer d'augmenter, passant de 590 millions actuellement à 1,2 milliards d'ici l'an 2025. De manière plus générale, le vieillissement se distingue notamment par son caractère intrinsèque, sa progressivité et son universalité. Cependant certaines sociétés soulèvent la question du vieillissement en tant que telle : tout le monde ne s'en fait pas la même représentation. Ainsi les études anthropologiques mettent en évidence que l'expérience du vieillissement diffère d'une culture à l'autre, pas forcément identique à celle que l'on peut rencontrée dans nos sociétés occidentales. Ceci souligne l'opposition qui peut exister entre le vieillissement biologique qui est un processus universel et commun à l'ensemble des sociétés humaines et la construction de l'image que l'on peut s'en faire (vieillesse) selon les différents types de société. L'Homme a donc mis en place divers « indicateurs » de vieillissement qui ont permis de dresser un constat indéniable et objectif du vieillissement de la population mondiale quelques soient les sociétés et les cultures.

a) Les indicateurs de mesure de vieillissement

L'espérance de vie est un indicateur bien connu de tous. Calculée à la naissance, elle permet d'estimer le nombre d'années qu'un nouveau-né « peut » espérer vivre. Mais cette durée est basée sur les statistiques de mortalité de la population de l'année où naît l'individu, donc concernant les individus beaucoup plus avancés en âge que le nouveau-né. Ce marqueur n'a pas grande signification quant à la « durée de vie » réelle des individus.

La durée de vie moyenne traduit plus fidèlement le vieillissement des populations. Cet indicateur plus récent peut également se définir comme le nombre moyen d'années vécues par la population entre deux instants, en émettant l'hypothèse que cette population connaît un rythme constant de naissances et qu'elle subit la mortalité « réelle » du pays. L'espérance de vie se définit de manière similaire mais avec l'hypothèse que la mortalité (par âge) soit restée

inchangée et identique aux taux observés entre ces mêmes instants. Ainsi, la durée de vie moyenne est un indicateur plus autonome, ne dépendant pas des structures par âge ou des conditions passées de migration ou de natalité et qui, en utilisant les seules données de mortalité, traduit beaucoup plus fidèlement le vieillissement des populations que ne le fait l'espérance de vie.

Il existe d'ailleurs un « indice de vieillissement » de la population (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques ; INSEE). Cet indice représente le nombre de personnes âgées de 65 ans et plus pour 100 personnes âgées de moins de 20 ans. Il permet de mesurer le degré de vieillissement d'une population. Plus cet indice est élevé, plus le vieillissement de la population est important. Ce facteur est directement impacté par les différents facteurs démographiques que sont l'espérance de vie des personnes les plus âgées et le taux de natalité.

Beaucoup plus récemment, un nouvel indicateur a vu le jour, « l'espérance de vie sans incapacité » (EVSI) qui permet d'évaluer combien de temps on peut espérer vivre sans incapacité. L'EVSI est un indicateur qui évalue la survie et la qualité de vie, apportant des informations qualitatives importantes. L'EVSI prend en compte l'incapacité au sens large qui s'étend de la limitation à l'impossibilité de la réalisation des activités habituelles. L'EVSI est calculée annuellement pour tous les pays de l'Union Européenne depuis 2005. La France, qui affiche l'espérance de vie la plus longue pour les femmes en 2009 et en 2010 occupe la 10ème place en terme d'EVSI, illustrant ainsi un cas de figure où longue vie ne coïncide pas forcément avec limitation d'incapacités et d'activités usuelles. Les hommes français occupent respectivement la 8ème et 11ème place, sur 27, en termes de longévité et d'espérance de vie sans incapacité avec les valeurs de 2009 (Colvez et Robine, 2012).

b) Le vieillissement de la population mondiale

Ainsi, ces indicateurs permettent à chaque instant d'estimer le vieillissement d'une population, d'un pays et également le vieillissement de la population mondiale. Une étude de l'ONU, intitulée « Vieillissement de la population mondiale : 1950-2050 », montre que le nombre des personnes de plus de 60 ans aura triplé et représentera deux milliards de personnes à l'échelle de la population mondiale, dépassant ainsi la population jeune (http://www.unfpa.org/news/2002/pressroom/ageing.html) (Figure 4).

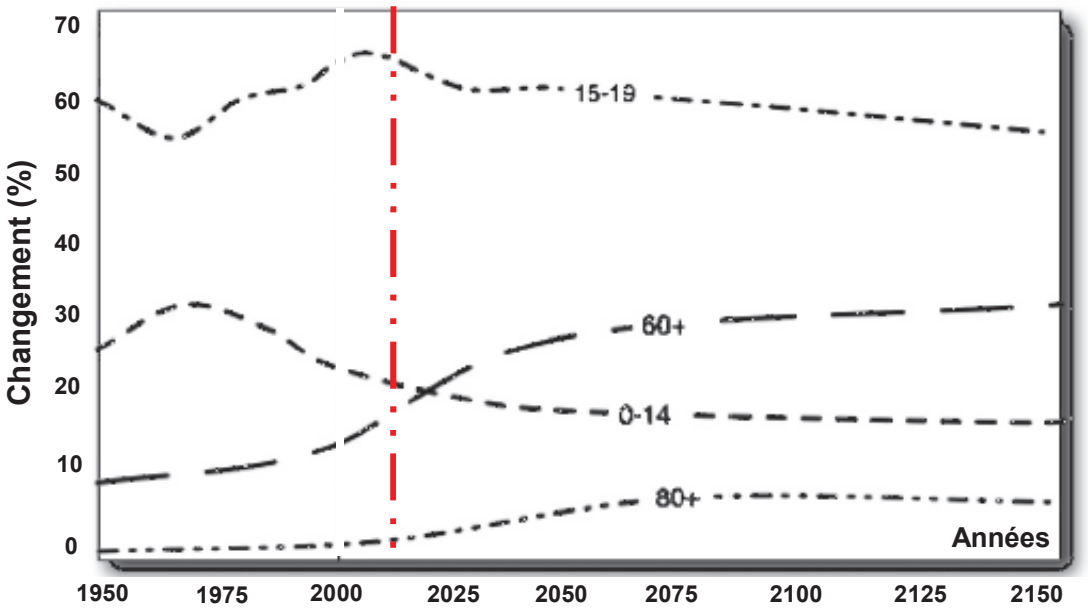


Figure 4. *Changement dans les proportions de la population mondiale pour les groupes d'âge suivants : entre 0-14ans ; entre 15-19 ans ; >60 ans (60+) et >80 ans (80+) sur la période 1950-2150. La ligne rouge pointillée correspond à 2012. (Adapté de Crews, 2007).*

C'est déjà le cas dans certains pays développés comme le Japon depuis 1998. Mais ce phénomène concerne à la fois les pays développés et ceux en voie de développement qui sont d'ailleurs les plus concernés par ce problème puisqu'en 2050, 80 % des plus de 60 ans vivront dans ces pays. Globalement, avec un accroissement de 2% chaque année, les seniors (>65 ans) représentaient 8 % de la population mondiale en 1950, 10 % en 2000 et ils constitueront 21 % de l'humanité en 2050.

Parallèlement l'espérance de vie s'allonge. Depuis 1950, l'espérance de vie moyenne mondiale est passée de 46 à 66 ans. Parmi les personnes atteignant l'âge de 60 ans, les hommes peuvent espérer vivre en moyenne encore 17 ans (77 ans), et les femmes 20 ans (80 ans). Nous avions l'habitude des pyramides d'âges « classiques », avec une base importante de jeunes et une pointe effilée de personnes âgées, mais dans les années à venir, toutes les classes d'âge seront sensiblement égales en nombre formant des "tours" dont la base pourra même être plus étroite que le sommet pour les pays avec un taux de natalité décroissant. Ainsi il a fallu 115 ans pour que la proportion des plus de 60 ans double en France (Figure 5). Il n'en faudra que 27 en Chine…

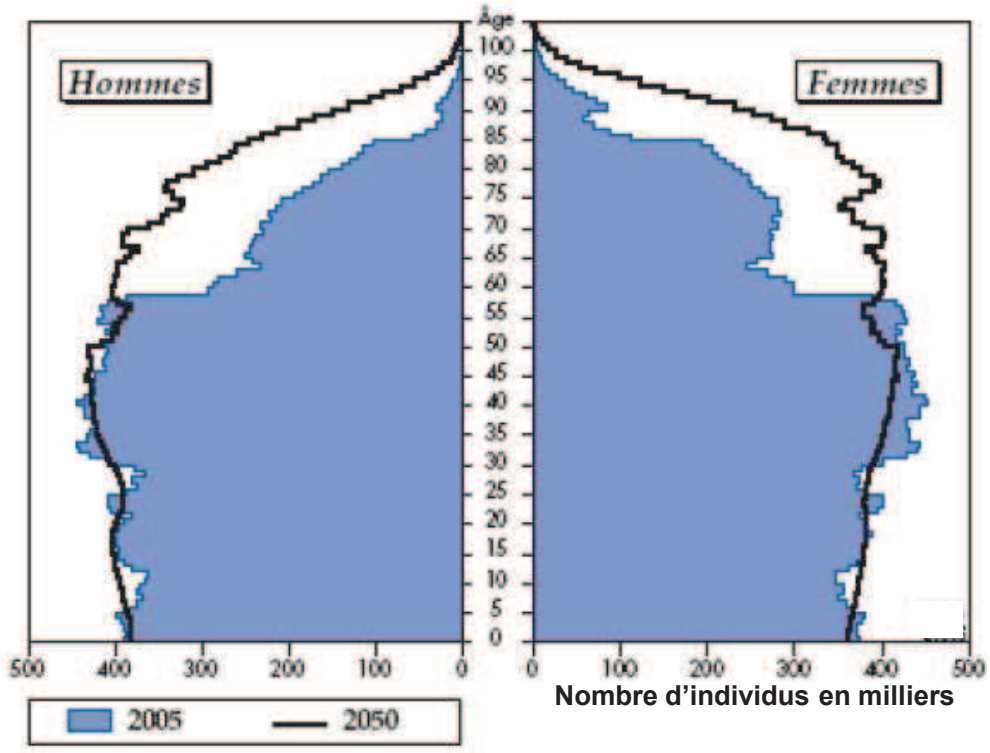


Figure 5. *Pyramide des âges chez les hommes et chez les femmes de la population française métropolitaine en 2005 et projections en 2050 (adapté du rapport ministériel « Vivre ensemble plus longtemps » ; Gimbert et Godot ; Juillet 2010).*

3) Le vieillissement chez l'Homme

a) Quels enjeux ?

Depuis plusieurs décennies, la Science et la Recherche se sont « emparées » du vieillissement, afin d'en identifier les causes, les conséquences et les mécanismes biologiques. Au-delà de sa dimension biologique, le vieillissement ne présente pas seulement des répercussions à l'échelle individuelle, mais aussi à l'échelle populationnelle et sociétale. Ces répercussions à grandes échelles peuvent être abordées comme des conséquences d'un processus universel mais surtout devraient être considérées comme des « enjeux ». Dans nos sociétés occidentales, à y regarder de plus près, le vieillissement est d'abord et avant tout synonyme d'une longévité plus importante pour chacun, ou plus encore, d'une longévité accrue en bonne santé. Dans ce contexte, il convient donc d'aborder le vieillissement comme un « défi à relever » qui pourrait s'accompagner de nombreuses opportunités pour les diverses dimensions sociétales comme l'économie et la culture. Ainsi, la vieillesse représente un

véritable « maillon » de la société, synonyme d'expérience et de sagesse qui ne doivent pas être oubliés au profit d'autres aspects comme la perte d'autonomie, les déficiences cognitives et donc la « diminution de soi ». Pour ces raisons, de nombreuses actions devraient être mises en place en tant que « politique publique » visant au maintien, par exemple, d'un niveau d'activité général, révélé primordial pour le bien-être, la santé et l'espérance de vie (Menec et al., 2003).

b) Les bio-marqueurs du vieillissement

De nombreuses publications ont décrit l'application et l'utilisation de bio-marqueurs du vieillissement en utilisant différents termes pour décrire des aspects distincts de ce processus. Une définition largement employée dans la littérature et introduite en 1998 au National Institut of Health (NIH) et remise à jour en 2001, présente le bio-marqueur comme « *un paramètre qui est objectivement mesurable et évaluable comme indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes, ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique* » (Biomarkers Definitions Working Group. Lesko et Atkinson, 2001). Les bio-marqueurs sont actuellement d'un immense intérêt dans le domaine de la recherche fondamentale ou de l'application clinique. D'ailleurs les efforts et les technologies déployés pour la validation de tels indicateurs biologiques se reflètent au travers de la quantité et de la croissance annuelle d'études consacrées à ce domaine. Les motivations sous-jacentes sont d'ailleurs évidentes, puisque les bio-marqueurs offrent un grand potentiel dans les pronostics, les préventions, les diagnostics et l'évolution d'événements biologiques (physiologiques, comportementaux…) tels que les pathologies, la validation de médicaments et de molécules thérapeutiques ou bien encore le vieillissement. Les bio-marqueurs du vieillissement ont également été définis par Richard Miller comme des paramètres qui répondent à trois critères (revus dans Butler et al., 2004) :

- le bio-marqueur doit prédire les réponses à une large gamme de tests physiologiques et/ou comportementaux sensibles à l'âge, d'une manière cohérente, et offrir une prédiction meilleure que l'âge chronologique;
- le bio-marqueur doit prédire la longévité restante, à un âge où 90% de la population est encore en vie, et ce, pour la plupart des maladies spécifiques qui peuvent affecter l'espèce étudiée;
- sa mesure ne doit pas modifier l'espérance de vie ou le(s) résultat(s) des tests sensibles à l'âge menés successivement sur l'espèce étudiée.

c) Un vieillissement, des vieillissements

Il existe d'importantes différences morphologiques et fonctionnelles entre sujets de même âge, les marqueurs biologiques présentent une variabilité plus importante avec l'avancée en âge. L'âge biologique et l'âge chronologique ne coïncident pas, et l'apparence physique renseigne souvent moins bien que les paramètres physiologiques ou que le nombre d'années. « *La sénescence n'est pas une pente que chacun descend à la même vitesse. C'est une volée de marches irrégulières que certains dégringolent plus vite que d'autres* » (Howell cité par De Beauvoir (De Beauvoir, 1970)) (Figure 6).

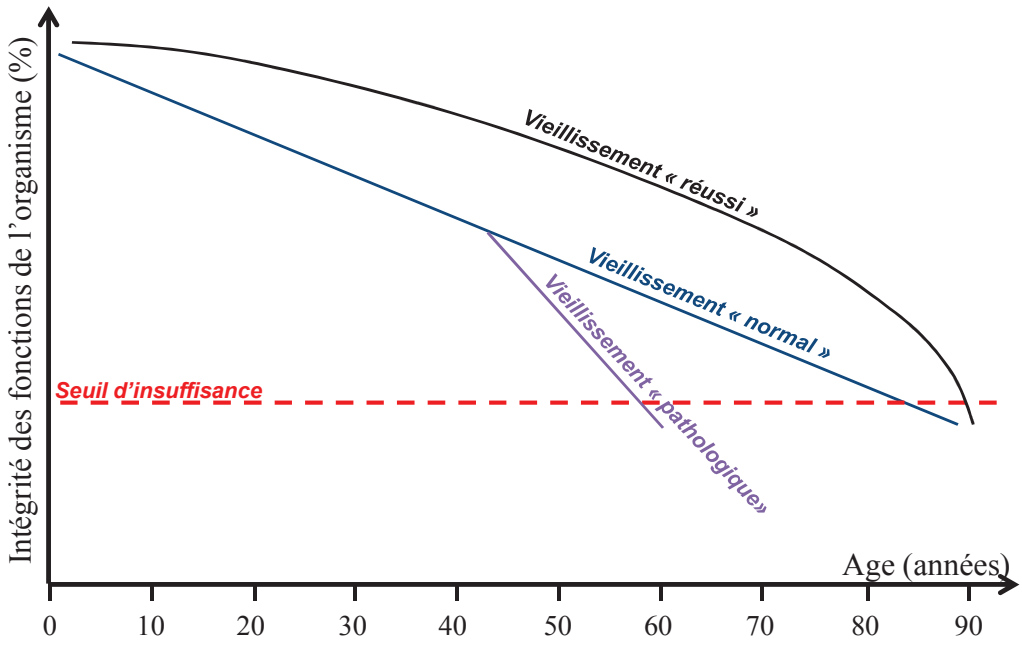


Figure 6. *Schéma de l'évolution des capacités des fonctions de l'organisme selon les trois types de vieillissement.*

Le vieillissement réussi. Havighurst est un des premiers auteurs à utiliser le terme de vieillissement « réussi » dans les années 1960 (Havighurst, 1958) mais il faudra attendre 1987 pour que Rowe et Kahn en proposent une définition : « peu ou pas de diminution des fonctions physiologiques liées à l'âge » (Rowe et Kahn, 1987). En 1989, Guralnick et Kaplan définirent ce terme comme la présence de peu, voire d'aucune maladie ou incapacité ou alors l'existence d'un niveau de performance physique élevé (Guralnick et Kaplan, 1989). Enfin, en 1998, Rowe et Kahn proposent une extension de leur première définition et qui requiert trois conditions : (i) une faible probabilité de maladie, d'incapacité et de facteurs de risques tels que tabagisme, hypertension artérielle, obésité… ; (ii) de bonnes capacités physiques et

intellectuelles ; (iii) un engagement actif dans la vie (relations avec d'autres personnes, implication dans des activités de production…) (Rowe et Kahn, 1998). Cette définition présente l'avantage d'être très opérationnelle mais il semble qu'une définition exacte et proche de la réalité semble très difficile à mettre en place. Comme l'ont montré Strawbridge et ses collaborateurs (2002), il y a une discordance entre le niveau de réussite du vieillissement tel que perçu par les personnes âgées elles-mêmes (50,3 %) et celui mesuré selon les critères de Rowe et Kahn (18,8 %).

Le vieillissement normal. Le vieillissement « normal » que d'autres appellent vieillissement « habituel » ou vieillissement « usuel » est caractérisé par « la réduction des capacités ou de certaines d'entre elles, sans que l'on puisse attribuer cet amoindrissement des fonctions à une maladie de l'organe concerné » (Blain et Jeandel, 2003). Elle commencerait très tôt à l'âge adulte et s'opérerait de façon progressive et continue. Son évaluation est basée sur la capacité fonctionnelle physiologique des individus, capacité dont le maintien de l'amplitude maximale dépend de facteurs génétiques et environnementaux (Organisation Mondiale de la Santé, 2002)

Le vieillissement « pathologique ». Le vieillissement « pathologique » s'accompagne de nombreuses maladies (maladies mentales, maladies neurodégénératives…) dont l'âge ne représente qu'un facteur de risque. Ces maladies, le plus souvent chroniques, concernent particulièrement les fonctions psychologiques, les fonctions cognitives, les capacités locomotrices, les capacités sensorielles et le système circulatoire. Ces maladies sont fréquemment associées à des troubles nutritionnels et peuvent exposer l'organisme à un risque majoré de maladies aiguës, en particulier infectieuses ou traumatiques. Elles doivent de ce fait être considérées comme des déficiences, à l'origine d'incapacités fonctionnelles parfois majeures et de handicaps (Jeandel, 2005).

Le vieillissement est un processus biologique qui n'épargne rien ni personne et qui parallèlement fascine les hommes depuis des générations. En ce début du XXIe siècle, les personnes âgées sont environ 600 millions dans le monde, soit trois fois plus qu'il y a 50 ans. Vers 2050, elles devraient être quelques 2 milliards, soit, là encore, une multiplication par trois en 50 ans. La longévité de Jeanne Calment (122 ans), bien qu'unique - et naturelle - à ce jour, n'a-t-elle pas apporté la preuve du gigantesque écart qui sépare la durée moyenne de vie et sa valeur extrême ? Les espérances de vie ne varient guère d'un

pays à l'autre et sont toutes croissantes, mais les espérances de vie sans incapacité diffèrent. Le vieillissement de la population engendre des enjeux nouveaux et considérables et nécessite une adaptation rapide des mentalités, des comportements, des modes de vie, des institutions... Enfin, pour mieux appréhender un tel processus il semble évident qu'il faut « apprendre » à le comprendre avant de vouloir le « maîtriser »…

II) Etudier le vieillissement

L'accroissement global de la durée de vie chez l'Homme et le vieillissement des populations sont des phénomènes assez récents et « nouveaux » du fait qu'ils engendrent une multitude de conséquences, de l'échelle individuelle à l'échelle populationnelle avec par exemple l'apparition de nouvelles pathologies liées à l'âge incluant les maladies neurodégénératives, qui nous font poser la question : « vieillir et vivre plus longtemps oui, mais dans quel état « fonctionnel » ? ». Les études sur le vieillissement se sont donc développées pour tenter d'apporter des réponses sur une échelle à trois temps : t-1 : comment prédire ce processus ? ; t : comment prévenir certaines pathologies et le déclin liés à l'âge ? ; t+1 : comment appréhender des durées de vie accrues ? L'augmentation du nombre relatif et absolu de personnes âgées (<65ans) dans nos sociétés constitue un défi pour la biologie, les sciences sociales et comportementales, et pour la médecine. La Recherche tente d'identifier les facteurs prédictifs de succès dans ces domaines critiques mais aussi les mécanismes du vieillissement. Le décor est « planté » pour les études visant à augmenter la proportion de notre population vieillissant avec succès.

1) Les théories du vieillissement

Les principales théories du vieillissement entrent dans trois catégories distinctes :

i. les théories évolutionnistes, qui interprètent le vieillissement comme un « caractère » qui a évolué, soit en raison de la sélection positive de mutations qui augmentent le succès reproducteur dans la première partie de la vie soit par l'absence de sélection à l'encontre des perturbations néfastes au cours de l'âge (Williams, 1957) ;

ii. les théories déterministes, postulant que la longévité et le vieillissement sont sous contrôle génétique direct ;

iii. les théories stochastiques, pour lesquelles le vieillissement est la conséquence d'événements non programmés et néfastes pour la cellule.

a) Les théories évolutionnistes

Les théories évolutionnistes du vieillissement sont basées sur les différences « âge-spécifique » qui contribuent à la reproduction et à la fitness d'un individu. L'idée d'un vieillissement programmé et bénéfique à l'espèce a été proposée en premier par Medawar (1952). Il argumentait que les individus âgés et plus aptes à la reproduction, « laissent la place » aux individus jeunes qui ont tout leur potentiel reproductif. Cette théorie se base sur l'hypothèse que la reproduction et la transmission du patrimoine génétique sont les principes premiers de la pérennité de toute espèce. Cette théorie a pourtant été largement réfutée par les observations réalisées parmi de nombreuses espèces et le constat que les individus meurent de diverses causes (prédation, facteurs environnementaux défavorables, etc.) avant que les premiers signes de vieillissement ne soient perceptibles. Ainsi généralement, le vieillissement n'est pas la première cause de mort des individus d'une espèce dans le milieu naturel.

b) Les théories déterministes

Les facteurs génétiques. Plusieurs travaux ont mis en évidence des relations étroites entre certains facteurs génétiques et le vieillissement. La manipulation de certains gènes a pu allonger la longévité chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*) et chez la mouche des fruits (*Drosophila melanogaster*). Chez l'Homme, les études menées chez les jumeaux ont montré que la durée de vie semble fortement liée à des facteurs génétiques. Chez les centenaires, certains génotypes sont retrouvés plus fréquemment que chez des sujets plus jeunes, indiquant qu'un terrain génétique particulier est associé à une plus grande longévité (Murabito et al., 2012). Enfin, l'origine génétique des syndromes de vieillissement prématuré (progéria) met en relief le rôle des facteurs héréditaires dans le contrôle du vieillissement.

Le raccourcissement télomérique. Les télomères (séquences d'ADN à l'extrémité des chromosomes) sont formés de plusieurs milliers de répétitions du motif TTAGGG. Ils ne contiennent pas d'information génétique propre (non-codante), mais permettent aux enzymes de réplication de faire la différence entre une extrémité de chromosome et un chromosome lésé. Au fil des divisions cellulaires (mitose), les télomères se raccourcissent et quand le

télomère devient trop court, il ne joue plus son rôle protecteur de l'ADN codant. La cellule va alors interpréter ceci comme une « erreur » du matériel génétique (sénescence réplicative). Ce processus représente pour la cellule une sorte de « compteur » des divisions cellulaires. Quand les télomères atteignent une longueur critique, la cellule ne peut plus se diviser (limite de Hayflick (Hayflick et al., 1997)) et devient la cible du processus d'apoptose (mort programmée cellulaire). Il est clairement établi que le raccourcissement des télomères est associé à un risque plus élevé de maladies liées à l'âge (Marques et al., 2010). En revanche, bien qu'il soit accéléré par le stress oxydant cellulaire et les réponses inflammatoires, il n'est pas démontré que son rôle dans les processus de vieillissement soit prépondérant.

c) Les théories stochastiques

Le stress oxydant et les radicaux libres. Les radicaux libres, dérivés actifs de l'oxygène, produits au cours de la respiration cellulaire, sont capables d'altérer le matériel génétique et les acides gras de la membrane cellulaire. L'organisme se protège contre ces radicaux par plusieurs systèmes : les superoxydes dismutase, les catalases, la glutathion peroxydase séléno-dépendante et les vitamines antioxydantes (A, E, C). Au cours du vieillissement, cet équilibre est altéré : la production de radicaux libres augmente au sein des mitochondries et les systèmes de défense et de protection sont moins efficaces. L'importance de ce mécanisme dans le vieillissement a été soulignée par l'induction expérimentale d'une surexpression du gène de la superoxyde dismutase et de la catalase chez la drosophile qui s'est traduite par une augmentation de leur longévité (Curtis et al., 2007). Un autre système de protection de l'organisme constitué par les HSP (Heat Shock Proteins) produites en réponse au choc thermique, aux traumatismes ou autres facteurs de stress, est altéré au cours du vieillissement (Morimoto, 2011). Ces protéines rendent les cellules plus résistantes vis-à-vis d'une nouvelle agression et aident les systèmes de réparation et le catabolisme des macromolécules endommagées.

Accumulation des « erreurs ». Les erreurs de réplication de l'ADN, les anomalies de la structure tertiaire ou quaternaire des protéines et l'altération de la glycosylation peuvent induire des lésions sur de multiples cibles de la cellule et de la matrice extracellulaire : sur l'ADN (mutations de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, raccourcissement des télomères), sur les protéines (notamment formation d'agrégats amyloïdes non dégradables), sur les lipides et sur les glucides. Ces dommages sont régulièrement réparés par des structures cellulaires

responsables de la surveillance et du maintien de l'homéostasie mais cette balance dommage/réparation est progressivement perturbée avec l'âge, et les dégâts cellulaires s'accumulent dans l'organisme. Le vieillissement pourrait alors être la résultante d'une accumulation de lésions oxydatives. C'est un biologiste des radiations, Harman, qui dès 1956 postula que les radicaux libres, produits sous l'effet des radiations ionisantes ou des rayons ultraviolets, pouvaient avoir un rôle dans le vieillissement (Harman, 1956). Il faudra attendre plusieurs décennies pour que les hypothèses d'Harman soient enfin admises et deviennent un sujet de recherche et de découvertes majeures. Plus de 40 ans après la publication d'Harman quelques études commencent à supporter la théorie du vieillissement « par les radicaux libres » (Beckman et Ames, 1998). Plus récemment, on a pu lui attribuer le statut de théorie scientifique solide, soutenue par les travaux des biologistes moléculaires (Orr et al., 1994, Migliaccio et al., 1999, Melov et al., 2000). Ainsi, l'incapacité à maintenir à un niveau stable l'apparition de ces dommages cellulaires serait le résultat d'une limite des ressources allouées à la préservation de l'intégrité du soma (toutes cellules de l'organisme exceptées les cellules germinales) (Kirkwood et al., 2000).

Les « erreurs de reconstruction ». Cette théorie, développée récemment par Wang et al., (2009) est légèrement différente de la précédente. Une erreur de reconstruction peut modifier la structure d'une molécule (protéine ou acides nucléiques) ayant subi des dommages liés à un facteur de stress, ce qui conduit au final à une dénaturation de cette molécule avec des répercussions sur la cellule. La nuance entre « dommage cellulaire » et « erreur de reconstruction » est primordiale à la compréhension des mécanismes cellulaires du vieillissement. Les dommages étant la cause du vieillissement alors que les erreurs de reconstruction en seraient la conséquence. Les erreurs de reconstruction seraient inévitables lorsque les dommages cellulaires sont trop fréquents et/ou trop importants. L'erreur de reconstruction est irréversible, aucune réparation ne peut la modifier et elle persiste au sein de la cellule jusqu'à ce que la cellule meure par accumulation de ces erreurs (apoptose). Ainsi, selon cette théorie, ce ne sont pas les dommages cellulaires qui s'accumulent au cours du vieillissement mais plutôt les erreurs de reconstruction.

La glycation non enzymatique protéique. Certaines protéines subissent des modifications au contact du glucose. Le glucose réagit spontanément (sans l'intervention d'enzymes) avec les groupements -NH des acides aminés, ce qui engendre des produits terminaux de la glycation, appelés « produits AGE » (Advanced Glycation End products). Les

protéines de la matrice extracellulaire, dont la durée de vie dans l'organisme est très longue, sont extrêmement exposées et sujettes à ce phénomène. La glycation modifie les propriétés de ces protéines, les rendant plus résistantes à la protéolyse (dégradation enzymatique des protéines) et empêchant leur renouvellement. De plus, les AGE induisent la formation de pontages moléculaires entre les fibres de collagène, rendant les membranes plus rigides et moins solubles. Les AGE pourraient avoir une action pro-inflammatoire en se liant aux récepteurs spécifiques des macrophages et des cellules endothéliales ou en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et/ou de facteurs de croissance. L'importance de la glycation des protéines, exacerbée dans le cadre de certaines pathologies comme le diabète de type II, a été soulignée par l'effet de médicaments inhibiteurs de la glycation se traduisant par un ralentissement du vieillissement de certaines fonctions chez des modèles animaux expérimentaux (Grillo et Colombatto, 2008).

2) Les différents types d'étude du vieillissement

a) Les études longitudinales

Les études longitudinales sont des outils privilégiés pour observer les changements au cours du vieillissement des individus. Ces études de l'évolution des paramètres individuels depuis la naissance et jusqu'à la mort naturelle peuvent avoir différents objectifs :

- décrire l'évolution de divers paramètres et des capacités d'adaptation en fonction des étapes du vieillissement. Cela permet de mettre en valeur la diversité des évolutions à l'intérieur d'un groupe d'individus, et possiblement à déterminer des sous-groupes d'individus en fonction des différences d'évolution ;
- déterminer si les caractéristiques observées chez la personne adulte sont corrélées aux caractéristiques individuelles de l'enfance ou du vieillissement. L'existence de telles corrélations permet de repérer des facteurs de risque et des bio-marqueurs « précoces » ;
- évaluer si l'intervention de certains facteurs expérimentaux pendant la trajectoire du vieillissement entraîne une modification, dans le sens d'une amélioration ou d'une aggravation, des sorties physiologiques et comportementales attendues à différents âges, par rapport à des caractéristiques initiales connues.

b) Les études de cohortes

Dans une étude dite de cohorte les sujets sont répartis en groupes en fonction de leur exposition à un traitement expérimental ou à un facteur non expérimental (obèse/non obèse). Chacun de ces groupes expérimentaux définit une « sous-cohorte ». La comparaison du taux de survenue de l'événement entre ces différentes sous-cohortes permettra de mesurer l'association entre exposition au(x) traitement(s) et événement. D'un point de vue pratique, l'étude de cohorte est la démarche d'observation la plus « proche » de l'essai randomisé ; la principale différence étant que dans un essai, l'attribution de l'exposition au traitement est réalisée par tirage au sort.

c) Les études transversales

Une étude transversale est une étude descriptive dont le principe est essentiellement de recueillir simultanément des informations sur les expositions et les événements de santé d'un échantillon représentatif de la population. Les enquêtes de prévalence sont un exemple typique de ces études transversales, dans lesquelles on évalue le nombre de malades présents dans la population à un instant donné, et qui identifie les facteurs associés aux variations de prévalence. Ces études transversales sont limitées par l'absence de description temporelle des expositions et des événements, mais peuvent permettre d'identifier des relations entre événement de santé et exposition lorsque celles-ci sont invariables dans le temps (par exemple : le sexe, le groupe sanguin...).

d) Les études comparatives

Les études comparatives reposent sur l'étude des variations existantes entre espèces (ou populations, sociétés, cultures…) pour des caractères donnés qui peuvent être dans notre cas, relatifs au vieillissement. Autrement dit, c'est une autre manière d'analyser l'influence d'un facteur sur un paramètre d'étude. Il s'agit de faire varier le facteur (nutrition, enrichissement du milieu…) à travers la diversité des espèces (ou populations, sociétés, cultures…) et d'observer les variations du paramètre d'étude (longévité, apparition de pathologies…). Ce type d'étude prend de plus en plus de place au sein des nombreuses recherches sur le vieillissement. Par exemple, cette méthode clé offre un potentiel important

dans la mise en valeur de mécanismes majeurs du vieillissement très conservés entre différents taxons, au cours de l'évolution.

3) Les modèles d'étude expérimentaux

D'importants progrès dans la compréhension des mécanismes du vieillissement ont été récemment apportés à l'aide des modèles expérimentaux du vieillissement. En considérant que les humains sont des mammifères diurnes à la sénescence progressive et à la durée de vie relativement longue, le choix des modèles animaux pour étudier les mécanismes du vieillissement humain reste l'une des questions les plus importantes dans le domaine de la recherche « moderne ». Tous les modèles existants ont certains avantages et certaines limites, appelant à l'utilisation de diverses espèces dans l'espoir que chacune d'entre elles fournisse un morceau du « casse-tête » et, ensemble, aideraient à identifier les éléments essentiels communs au vieillissement chez tous les organismes. Ceci explique pourquoi les recherches actuelles sont réalisées simultanément sur plusieurs espèces, phylogénétiquement différentes telles que les organismes unicellulaires, les vers ronds, les insectes, les rongeurs et les primates non humains.

a) Les unicellulaires

Les bactéries. Et plus particulièrement, *Deinococcus radiodurans,* qui présente des propriétés remarquables de résistance aux facteurs de stress et plus précisément au stress oxydatif. *D. radiodurans* affiche une résistance remarquable à tous les agents oxydants et notamment ceux produits par des agents extrinsèques comme la dessiccation ou l'irradiation qui peuvent être à l'origine de dommages irréversibles de l'ADN double brin du génome de la bactérie. Des études ont montré que cette bactérie, exposée à des doses très élevées de rayonnements ionisant, peut survivre et ne pas subir de dommages au niveau de ses protéines même si son matériel génétique est entièrement morcelé et endommagé par les rayons. La robustesse de cette bactérie serait due à un déploiement de mécanismes de résistance au stress induits par les forts dégâts liés au stress oxydatif dans la cellule (voir pour revue, Slade et Radman, 2011).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est l'un des modèles les plus utilisés dans la recherche liée au vieillissement (Figure 7). La facilité relative et la rapidité avec laquelle le

vieillissement et la longévité peuvent être quantifiés chez la levure ont permis de rapides progrès à l'échelle des mécanismes moléculaires du vieillissement et via l'identification des dizaines de facteurs qui modifient sa longévité. Malgré un éloignement phylogénétique évident, les résultats obtenus chez cet organisme peuvent faire l'objet de comparaisons pertinentes avec les résultats chez l'Homme. Bien que certains aspects du vieillissement chez la levure soient spécifiques à cet organisme, bon nombre des caractéristiques a été conservé au cours de l'évolution entre les espèces invertébrées, les rongeurs et même l'Homme. Deux modèles de vieillissement ont été établis chez la levure: le vieillissement réplicatif et le vieillissement chronologique. Le vieillissement réplicatif est un modèle du vieillissement des cellules actives en division chez lesquelles la durée de vie d'une cellule mère est définie par le nombre de cellules filles produites avant la sénescence. La durée de vie réplicative est mesurée par l'élimination physique des cellules filles, faciles à distinguer des cellules mères.

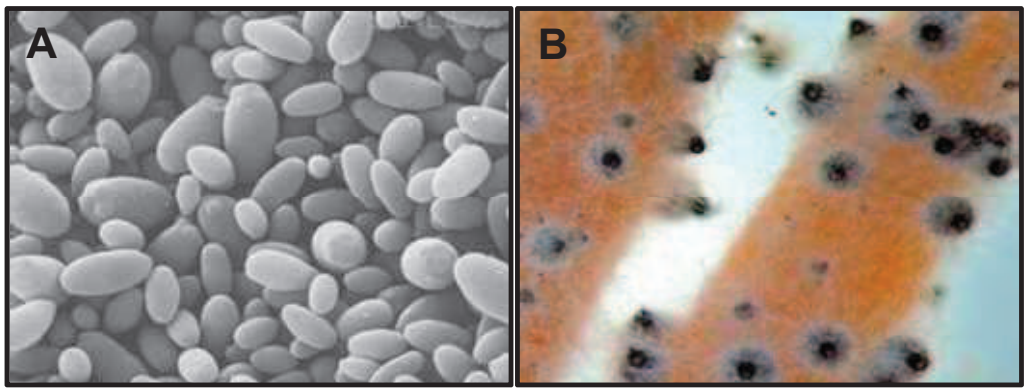


Figure 7. *Modèles unicellulaires des études du vieillissement. A : la levure, Saccharomyces cerevisiae ; B : le champignon filamenteux Podospora anserina.*

Le vieillissement chronologique est un modèle du vieillissement des cellules post-mitotiques pour lesquelles la durée de vie est définie par le nombre de cellules en état de quiescence (sans division). La durée de vie chronologique est couramment évaluée par culture cellulaire en milieu liquide, dans lequel les cellules ne peuvent plus se diviser lorsque la source carbonée est épuisée. La viabilité de ces cellules est d'ailleurs contrôlée en les replaçant dans un milieu renouvelé et riche en sources carbonées (voir pour revue, Kaeberlein, 2010).

L'ascomycète *Podospora anserina* est un champignon filamenteux utilisé pour étudier les bases moléculaires du vieillissement (Osiewacz, 2002) (Figure 7). Au cours de ces 10 dernières années, il a été démontré que le vieillissement et la longévité sont à la fois une

résultante des facteurs génétiques et environnementaux. Une caractéristique du vieillissement des souches sauvages de *P. anserina* est la réorganisation de l'ADN mitochondrial (ADNmt), accompagnée par une perturbation de l'activité et de la biogénèse mitochondriales (Belcour et Vierny, 1986). Il a été montré que la stabilisation des ADNmt joue un rôle crucial dans le contrôle de la durée de vie accrue. Des recherches plus récentes ont révélé que le type de respiration utilisée par cet organisme a un impact important sur le vieillissement (Gredilla et al., 2006). Normalement, ce champignon respire via une cytochrome-C oxydase (COX, complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale), mais lorsque cette voie est altérée, une compensation appelée « réponse rétrograde » est induite par un gène codant pour une oxydase alternative, ce qui permet à l'organisme de survivre (Gredilla et al., 2006).

b) Les invertébrés

Depuis Sydney Brenner, qui a été le premier à introduire le ver *C. elegans* comme modèle expérimental dans les années 1960, ce nématode a prouvé ses mérites dans son utilisation dans la recherche scientifique (Figure 8). Sa croissance et son cycle de reproduction rapides allant de 1 à 3 jours (Luo, 2004) permettent l'observation et l'utilisation de milliers d'animaux sur plusieurs générations pour des laps de temps relativement courts. *C. elegans* est hermaphrodite et produit près de 300 descendants par autofécondation. Outre la possibilité de développer une population homogène, ce vers de petite taille (1mm) peut être traité en grand nombre. Son génome entièrement séquencé a révélé entre 60% et 80% de gènes communs avec les humains (disponible sur http://www.wormbase.org). Les manipulations génétiques sont donc facilitées chez cette espèce, ce qui rend évident la création de mutants. Plusieurs exemples illustrent la puissance de *C. elegans* dans le dépistage de nouveaux médicaments (Moy et al., 2006), y compris de nombreux médicaments à usage humain (Hawasli et al., 2004 ;Gottschalk et al., 2005). Aujourd'hui, certaines molécules provenant de tests de validation chez ce ver sont à des stades avancés dans la découverte de nouveaux médicaments (Artal-Sanz, 2006). De plus, la simplicité de son système nerveux, constitué de 302 neurones (chez un nématode adulte), fait de cet organisme un outil performant pour le criblage de médicaments qui ont pour cible le système nerveux, donc précieux dans le cadre de la mise en place de molécules contre la neurodégénérescence associée à l'âge.

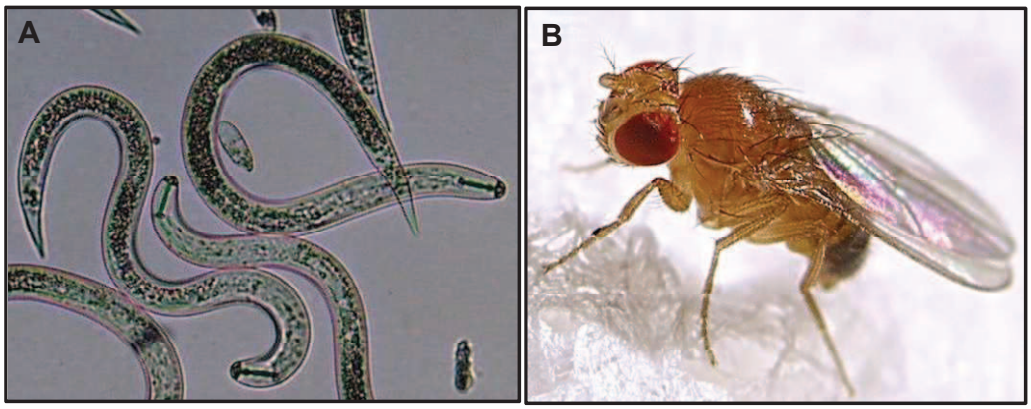


Figure 8. *Modèles invertébrés des études du vieillissement. A : le ver nématode, Caenorhabditis elegans ; B : la drosophile, Drosophila melanogaster.*

La drosophile, encore appelée mouche des fruits, est un modèle très prometteur pour identifier les mécanismes génétiques et les mécanismes qui influencent le déclin fonctionnel lié à l'âge (Figure 8). De plus, certaines séquences génétiques sont relativement bien conservées entre la drosophile et l'humain (Adams et al., 2000). Par conséquent, l'utilisation de ce modèle peut faciliter l'identification des engrenages génétiques sous-jacents aux caractéristiques phénotypiques liées au vieillissement. Bon nombre de changements comportementaux associés au vieillissement chez l'Homme sont également observés chez la drosophile (Grotewiel et al., 2005). De nombreux essais ont été développés pour quantifier différents comportements au cours de l'âge chez les drosophiles (Grotewiel et al., 2005). Le déclin des fonctions de la drosophile est probablement du à des perturbations de certains systèmes de l'organisme, par opposition à une détérioration généralisée des fonctions organiques (Cook-Wiens et Grotewiel, 2002). Les nombreuses études développées à partir de ce modèle constituent un outil puissant d'exploration des bases génétiques du vieillissement qui joue un rôle majeur dans le déclin des fonctions de l'organisme, comme celui observé chez l'Homme.

Les mollusques. L'avantage distinct des bivalves par rapport aux modèles classiques du vieillissement, est leur coquille constituée de carbone. Ainsi, la coquille peut servir à la détermination de l'âge individuel et, en même temps, elle représente un véritable enregistrement des changements de conditions environnementales qui ont eu lieu tout au long de la vie de l'animal. La croissance et la composition de la coquille sont soumises aux variations extrinsèques, ce qui signifie qu'elles peuvent être modifiées par des facteurs environnementaux tels que la température ambiante de l'eau ou de l'air et la disponibilité en

aliments (Ridgway et al., 2010). Ainsi, les bivalves révèlent non seulement leur âge chronologique mais aussi « l'enregistrement » des paramètres environnementaux importants à la construction de l'individu et de la population. Cela ouvre le champ à une nouvelle approche éco-physiologique du vieillissement chez les organismes aquatiques et permettra peut-être une distinction plus claire entre l'impact des effets intrinsèques (génétiquement fixés) et extrinsèques (l'environnement) sur les marqueurs du vieillissement et de la longévité (Abele et al., 2009).

Les crustacés. D'après des études récentes, l'écrevisse marbrée (*Procambarus marmor*) ne présente ni sénescence reproductive marquée, ni déclin dans l'organisation structurelle de leurs tissus et de leurs organes vitaux au cours du temps (Vogt, 2010). Cette particularité vient du fait que la taille de l'écrevisse (et des crustacés en général) n'est jamais vraiment définie, accompagnée d'une activité des cellules somatiques et germinales tout au long de la vie de l'individu. De plus c'est une espèce qui présente de nombreuses cellules souches notamment au niveau du cœur ce qui la place en modèle de choix pour les études sur les cellules souches (Vogt, 2008). Certains crustacés peuvent d'ailleurs atteindre des durées de vie proche de 100 ans et sont des organismes très résistants à la formation de tumeurs et au développement de cancer, même à des âges avancés. Ce modèle pourrait s'avérer utile pour appréhender les mécanismes de protection déployés par l'organisme pour lutter à la fois contre un déclin général des fonctions de l'individu et pour lutter contre le développement de pathologies liées à l'âge.

c) Les poissons

Le poisson tacheté, *Nothobranchius furzeri*, pourrait représenter un modèle vertébré alternatif pour l'étude du vieillissement (Genade et al., 2005) (Figure 9). Ce poisson habite les étangs saisonniers dans le Sud-Est de l'Afrique et a été capturé pour la première fois en 1968 au Zimbabwe. Depuis la population a été maintenue, considérée comme la souche GRZ. La durée de vie maximale d'un poisson de cette souche est de 12-13 semaines en captivité (Terzibasi et al., 2006) et parfois même 16 semaines (Hartmann et al., 2009). Ce modèle présente une croissance et une maturité sexuelle rapides ainsi que des caractéristiques typiques du vieillissement comme une baisse de la capacité d'apprentissage avec le temps (Valenzano et al., 2006). De manière intéressante, la durée de vie maximale est prolongée de façon significative par une diminution de la température de l'eau ou par une supplémentation alimentaire en resvératrol, caractérisés par l'apparition tardive du déclin cognitif et de

l'expression des bio-marqueurs du vieillissement (Valenzano et al., 2006). Il existe plusieurs autres espèces africaines de *Nothobranchius*, qui vivent plus longtemps que *N. furzeri*, y compris *N. kunthae* (37 semaines) et *N. guentheri* (52 semaines ; Genade et al., 2005), offrant la possibilité d'étudier naturellement des phénotypes de vieillissement à la fois chez *N. furzeri* et parmis les espèces *Nothobranchius*. Récemment, une étude visant à valoriser cet invertébré comme modèle pertinent pour l'étude du vieillissement, a d'ailleurs tenté de caractériser les spécificités cytogénétiques, génomiques et phylogénétiques de *N. furzeri* en comparant ces résultats avec ceux trouvés chez d'autres espèces de poisson (*Oryzias latipes* ; *Gasterosteus aculeatus* ; *Tetraodon nigroviridis* et le poisson zébre, *Danio rerio*). Ces espèces servent déjà de modèles dans de nombreux domaines de la recherche contemporaine, tels que la génomique, la biologie du développement, la génétique et les études sur le vieillissement (Reichwald et al., 2009).

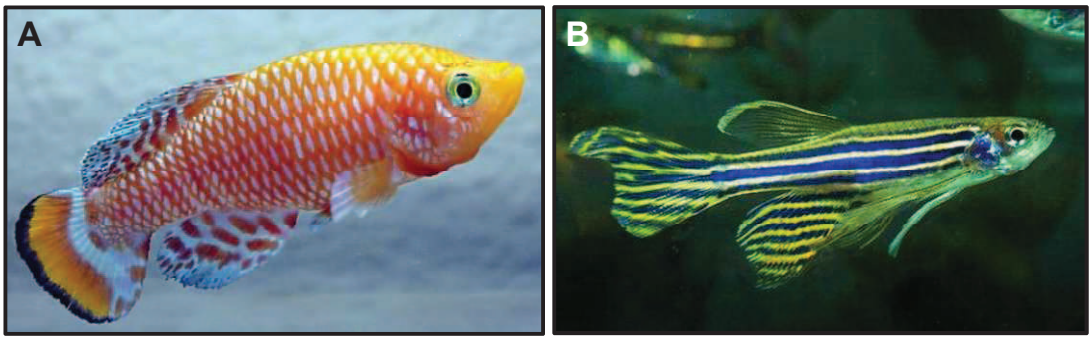


Figure 9. *Modèles vertébrés poissons des études du vieillissement. A : Nothobranchius furzeri ; B : Danio rerio.*

Récemment, le poisson-zèbre (*Danio rerio*), d'une durée de vie en captivité comprise entre 3 et 5 ans, a émergé comme un modèle très prometteur pour les études de vieillissement des vertébrés (Keller et Murtha, 2004) (Figure 9). En plus de leur petite taille et de leur taux de fécondité élevé, il est un des modèles favoris de la biologie du développement car il est complètement transparent au stade embryonnaire et larvaire (voir pour revue Kishi, 2011). La caractérisation du génome du poisson-zèbre a été établie, ce qui a permis le développement de multiples phénotypes mutants et transgéniques, ainsi que l'émergence de nouvelles techniques de génétique moléculaire permettant l'étude des mécanismes intrinsèques sous-jacents aux états physiologiques normaux mais aussi pathologiques naturels ou induits (Lieschke et al., 2007). Par conséquent, parmi tous les modèles vertébrés étudiés à ce jour, les poissons offrent

des résultats rapides dans plusieurs domaines de la recherche et de manière plus rentable que n'importe quel autre organisme vertébré.

d) Les rongeurs

Jusqu'à présent, seuls les rongeurs ont servi comme modèle vertébré « populaire » pour répondre aux questions spécifiques au vieillissement. La recherche sur les rongeurs fournit des informations importantes sur le vieillissement chez les mammifères et continuera d'être indispensable dans l'étude du vieillissement chez les vertébrés (Hasty et al., 2003). Parmi les nombreuses études menées sur des modèles rongeurs et principalement la souris (*Mus musculus*) loin devant le rat (*Rattus norvegicus*) (Figure 10), plusieurs interventions ont été menées, notamment en bio-gérontologie : utilisation de composés qui peuvent étendre la durée de vie (Selman et Withers, 2011), application de la restriction calorique, mutations spontanées ou induites qui affectent génétiquement la durée de vie (voir pour revue Liang et al., 2003), détermination de la durée de vie de plusieurs souches consanguines (Yuan et al. 2009), mise en évidence des régions génomiques associées au vieillissement (de Haan et al., 1998; Lang et al. 2010; Rikke et al., 2010).

Par ailleurs, certaines lignées sélectionnées par les chercheurs ont permis la création de mutants pour les études du vieillissement et un des exemples les plus connus est la « senescence accelerated mouse » (SAM) (Takeda et al., 1981) (Figure 10). Créé au début des années 70, ce modèle SAM est caractérisé par sa durée de vie raccourcie et une manifestation précoce de divers signes de vieillissement, y compris des changements de l'activité physique, de la peau, des yeux, des muscles et des os.

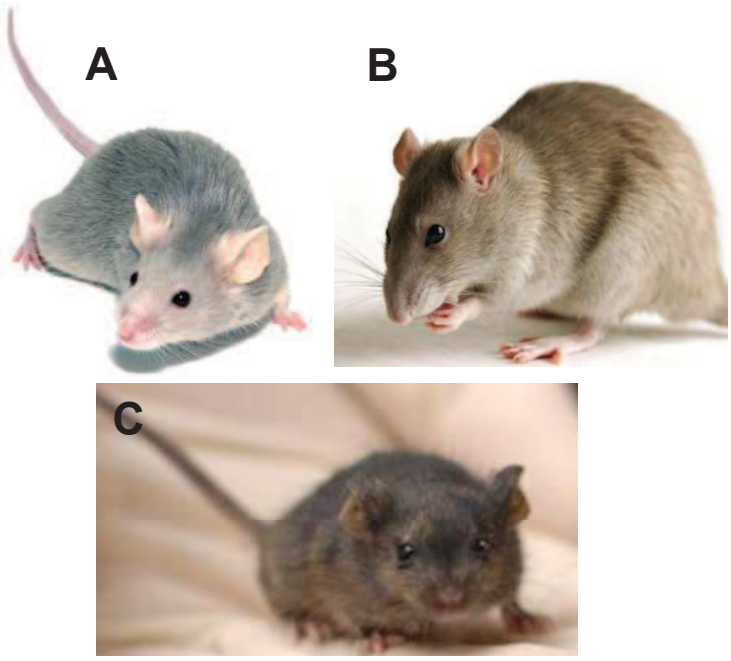


Figure 10. *Modèles vertébrés rongeurs des études du vieillissement. A : la souris Mus musculus ; B : le rat Rattus norvegicus ; C : la « senescence accelerated mouse SAM ».*

Chez ce modèle SAM, deux pathologies sont particulièrement fréquentes, il s'agit du dépôt d'amyloïdes séniles et de la cataracte (Hosokawa et al., 1984). Il y a maintenant de nombreux modèles murins de maladies liées à l'âge que l'on trouve chez l'Homme telles que l'hypertension, la maladie d'Huntington, la maladie de Parkinson, le diabète (type II), et de nombreuses formes de cancer. La plupart de ces modèles expérimentaux sont potentiellement pertinents puisqu'ils permettent de se rapprocher de la physiopathologie humaine, cependant aucun de ces modèles n'offre une imitation parfaite de la maladie correspondante et de ses conséquences complexes sur l'ensemble de l'organisme (interactions organes-organes, système vasculaire…). Des études comparatives sont actuellement en cours au Centre de vieillissement du Laboratoire Jackson (implanté à Bar Harbor, Maine et à Sacramento, Californie, USA) et constituent « the Aging Phenomene Project », pour caractériser la durée de vie et les phénotypes du vieillissement de 32 souches différentes, afin de fournir une base de référence pour l'utilisation ultérieure de modèles murins transgéniques ou mutants pour améliorer la compréhension de la régulation génétique du vieillissement. Ce projet comprend à la fois des études longitudinales et transversales de plusieurs fonctions organiques (rénale, cardiaque, musculaire…) (Yuan et al., 2011).

Le rat-taupe nu. Le rat-taupe nu (*Heterocephalus glaber*) a été décrit en 1842 en Ethiopie pour la première fois par Eduard Rüppell. Le rat taupe, bien que naturellement

consanguin (dû à son eusocialité), ne souffre pas des pathologies communes retrouvées chez les lignées de laboratoire et présente une durée de vie naturellement longue de 28-30 ans (en captivité, Buffenstein, 2008) contre 2 à 3 ans chez le rat (*Rattus norvegicus*). La mortalité des adultes jusqu'à l'âge de 24 ans ne semble pas augmenter avec l'âge, et les décès se produisent avec une fréquence égale parmi tous les groupes d'âge (Buffenstein, 2008). Le rat taupe adulte présente des taux d'apparition de pathologies très faibles et son état physiologique reste à un état « jeune » : il conserve une composition corporelle, un taux métabolique basal et une absorption gastro-intestinale stables pendant au moins 70% de sa durée de vie (Buffenstein 2008; O'Connor et al. 2002). Compte tenu de sa longévité exceptionnelle, accompagnée d'un taux métabolique basal réduit (75% de celui attendu sur la base de la taille du corps par rapport à des animaux de taille semblable), le rat taupe nu présentent la plus haute dépense énergétique (masse-dépendante) de tous les mammifères connus (O'Connor et al. 2002). Par ailleurs, il ne montre aucun déclin cognitif lié à l'âge, et la présence (ou absence) de plaques extracellulaires ou de maladies neurodégénératives n'a jamais été mise en évidence. Ceci serait dû à des facteurs de croissance neurotrophiques propres à cette espèce qui pourraient contribuer au maintien de l'intégrité neuronale et à l'activation de la neurogénése au stade adulte, même à un âge avancé (voir pour revue, Edrey et al., 2011).

e) Les oiseaux

Certains représentants du groupe des oiseaux ont une durée de vie maximale deux fois supérieure en moyenne à celle des mammifères terrestres de taille comparable (Hulbert et al., 2007). La comparaison dans la littérature entre mammifères et oiseaux est plutôt courante et fait souvent référence à des études sur la théorie du vieillissement des radicaux libres (Harman, 1956). La comparaison la plus commune entre oiseau et mammifère est celle du rat versus pigeon. Le rat a une durée de vie maximale de 5 ans environ alors que le pigeon peut vivre jusqu'à 35 ans. Cette grande différence a longtemps été expliqué par une différence de taux métabolique (Brand et al., 1991). Ainsi, la différence de longévité est surprenante pour deux raisons : 1) le taux métabolique des oiseaux est généralement plus élevé, 2) les oiseaux ont des températures corporelles généralement plus élevées que celles des mammifères (41°C vs 37°C en moyenne). Les études précédentes ont majoritairement conclu que la baisse de production d'espèces réactives à l'oxygène chez les pigeons par rapport aux rats était la raison de leur plus grande longévité. Ces résultats étant fondés principalement sur les données

émanant d'un seul tissu (le cœur) et en utilisant un seul substrat mitochondrial (le succinate), une étude récente a réitéré l'expérience sur plusieurs tissus (foie, muscle, cœur) et il s'avère que la seule différence observée entre le rat et le pigeon est la composition en acides gras des membranes, conférant une fragilité plus accrue aux dommages oxydatifs chez le rat que chez le pigeon (Montgomery et al., 2011).

f) Les primates non-humains

L'utilisation d'espèces phylogénétiquement proches de l'Homme, comme les primates non-humains (PNH), permet une évaluation critique des mécanismes du vieillissement physiologique et cognitif qui pourrait être spécifique aux primates (Herbig et al., 2006 ; Francis et al., 2008). C'est en grande partie en raison de notre incapacité à recueillir des données comportementales, physiologiques et pathologiques chez l'Homme dans un court intervalle de temps que la recherche, la validation et l'utilisation d'un modèle pertinent du vieillissement s'avèrent primordiaux. Ce modèle devrait permettre une « translation » des résultats ainsi qu'une application potentielle à l'Homme, ce qui a conduit à l'utilisation de PNH. De plus, les PNH ont un répertoire comportemental riche et bien étudié, paramètre qui est adapté pour des études sur le vieillissement normal, le déclin des fonctions cognitives ou l'apparition d'atrophie cérébrale. Non seulement il est possible de recueillir un large éventail de données comportementales, morphologiques, biochimiques et moléculaires plus rapidement que chez l'Homme, mais les possibilités sont également plus larges pour l'exploration de traitements et d'interventions qui cherchent à réduire les expressions du vieillissement grâce à des protocoles anti-âge.

Le représentant PNH majoritaire des études sur le vieillissement est le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), espèce de « l'Ancien Monde » (sous-continent indien et allant jusqu'en Chine) couramment utilisé dans la recherche biomédicale en raison de sa ressemblance avec l'Homme au niveau génétique (plus de 90% de ressemblance avec le génome humain, Sibley et Ahlquist, 1987), hormonal, musculaire, osseux, physiologique, neuro-anatomique, et bien sûr au niveau du cycle de vie et du vieillissement (Ramsey et al., 2000) (Figure 11). Le singe rhésus a une puberté comprise entre 2,5 et 4,5 ans et est sexuellement mature entre 6 et 10 ans. La femelle déclare la ménopause vers la 20ème année de vie. En captivité, l'espérance de

vie médiane est d'environ 26 ans et 10% des individus survivent au-delà de 35 ans alors que la durée de vie maximale est d'environ 40 ans (Lane et al., 2002).

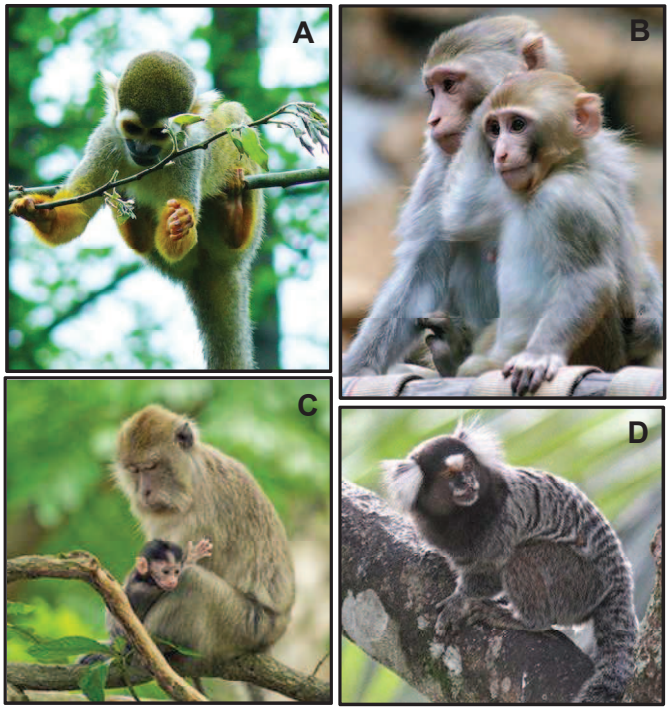


Figure 11. *Les primates non-humains utilisés pour les études du vieillissement. A : le singe écureuil Saimiri sciureus ; B : le macaque rhésus Macaca mulatta ; C : le singe cynomolgus Macaca fascicularis et D : le marmouset commun Callithrix jacchus.*

Le singe écureuil (*Saimiri sciureus*) est également largement utilisé dans les études concernant les fonctions motrices et le comportement, mais aussi dans les études d'immunologie et de virologie (Figure 11). Le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) est également de plus en plus employé (Figure 11). De plus petits PNH, comme le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), sont également utilisés dans bon nombre d'études biomédicales sur les fonctions du système circulatoire (hypertension artérielle) et cardiaque, et de plus en plus dans des études liées au vieillissement (Ross et al., 2012) ainsi que dans les études du déclin cognitif associé à l'âge (Figure 11). Cependant ces différentes espèces de primates présentent des durées de vie assez variées ce qui peut parfois limiter les études longitudinales (comme chez les macaques) car les données finales de survie par exemple ne sont pas accessibles avant un grand laps de temps. D'ailleurs, des analyses comparatives ont étudié la variabilité existante entre les différentes durées de vie des primates. Judge et Carey (2000) ont compilé des données sur la durée de vie maximale observée chez 53 genres de primates.

L'écart de durée de vie observé entre les genres a été expliqué en grande partie par la masse du cerveau et la taille du corps. Ils ont conclu que la longévité humaine reflète un héritage phylogénétique associé à l'évolution de la taille du corps et à une encéphalisation avancée (Judge & Carey, 2000).

Cependant, les PNH communément utilisés présentent des inconvénients non négligeables car les animaux âgés sont rares et leur longue durée de vie rend difficile toute étude longitudinale, c'est-à-dire l'observation des mêmes individus à différents âges. Ces dernières années, un intérêt croissant s'est donc porté sur un petit primate, le Microcèbe (*Microcebus murinus*), comme nouveau modèle PNH du vieillissement (Languille et al., 2012). La connaissance de ses traits de vie, le succès de son élevage en captivité, sa durée de vie relativement courte (8-10 ans) et la caractérisation de l'évolution de nombreux paramètres biologiques en fonction de l'âge comme le métabolisme basal ou la masse corporelle (Perret et Aujard, 2006) en font un modèle très intéressant pour l'étude des altérations physiologiques, comportementales et cérébrales liées à l'âge chez les mammifères dont l'Homme. Des perturbations des rythmes d'activité locomotrice, caractérisées en particulier par une fragmentation et une augmentation de l'activité pendant la période de sommeil diurne sont également classiquement observées chez les microcèbes âgés (Aujard et Perret, 2006). L'évaluation des capacités cognitives, des performances motrices et de l'atrophie cérébrale est également largement étudiée (Picq et al., 2012). L'ensemble des résultats acquis chez cette espèce, et qui présentent de fortes similitudes avec les données établies chez l'Homme, conforte l'utilité et la pertinence de ce modèle PNH pour la caractérisation du vieillissement.

« Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux ». Cette citation de Jonathan Swift trouve tout son sens aujourd'hui, à l'heure où les études foisonnent pour percer le secret du vieillissement. Ainsi la course à la découverte des mécanismes sous-jacents au vieillissement est devenue l'occupation d'un bon nombre de chercheurs, multipliant les ressources et les modèles d'études pour trouver les perles rares mais aussi pour apporter un élément nouveau à cet immense puzzle qu'est le vieillissement. Les organismes unicellulaires et les invertébrés ont permis d'établir une base solide pour l'approche moléculaire et génétique du vieillissement en mettant en évidence une partie des voies cellulaires impliquées. L'utilisation de ces modèles, bien que phylogénétiquement éloignés de l'Homme, permet d'obtenir des résultats assez rapidement au vu de leur cycle biologique court et permet également d'utiliser des moyens d'investigations performants

parfois difficiles à appliquer chez des modèles phylogénétiquement plus proches de l'Homme. Les modèles vertébrés, aquatiques ou terrestres, ont quant à eux permis de grandes avancées dans le domaine de la gérontologie, avec l'utilisation intensive de modèles transgéniques et mutants. Cependant bien qu'ils présentent divers avantages, et notamment leur durée de vie relativement courte, ces modèles peuvent présenter des limites à long terme au niveau de l'étude des interactions entre systèmes organiques ou lors d'études à très long terme faisant appel à des processus beaucoup plus lents que la durée de vie de ces petits organismes. L'utilisation de modèles longévifs tels que certains primates non humains s'est donc révélée pertinente et primordiale pour aborder les mécanismes propres au vieillissement.

III) Lutter contre le vieillissement

1) Dans quel contexte ?

Une des conséquences les plus évidentes du vieillissement est le déclin général des fonctions de l'organisme qui affecte tous les aspects de la vie humaine dont les activités, le déplacement, le maintien... Il y a donc une diminution globale de l'aptitude des organismes plus ou moins marquée suivant les environnements qu'ils occupent.

Ce déclin est progressif et les signes d'un dysfonctionnement majeur apparaissent plutôt après 60 ans chez l'humain. Étant donné que le processus du vieillissement est lent et progressif, il offre *a priori* la possibilité d'intervenir et d'améliorer les capacités fonctionnelles générales de l'individu. Ainsi une intervention débutée « tôt » dans le déclin, lorsque les perturbations sont encore faibles, serait susceptible de ralentir les pertes de fonctions avant leur étendue plus sévère et leur généralisation. Cette intervention à un moment pertinent pourrait alors ralentir le processus du vieillissement avec une augmentation significative de la durée de vie.

Certains des effets du vieillissement sont assujettis à des facteurs biologiques. Par conséquent, ils sont potentiellement modulables par des actions spécifiques. Il est donc envisageable de ralentir -ou peut-être même de stopper- le processus de vieillissement par l'intermédiaire de facteurs ou d'agents externes. Mais la question est « à quel moment doit-on intervenir ? » Il faut donc pouvoir prévoir un instant, une date, une période. Prévoir dans le contexte du vieillissement, c'est anticiper les conséquences physiologiques, psychologiques et

comportementales de l'avancée en âge. La prévention des effets du vieillissement peut être envisagée à travers les stratégies suivantes :

- ralentir les processus du vieillissement biologique (vieillissement intrinsèque)
- promouvoir les capacités physiques, cognitives et biologiques
- agir sur les facteurs de risque pouvant induire des maladies chroniques et incapacitantes,
- dépister précocement des maladies asymptomatiques liées à l'âge.

Willett (2002) a récemment souligné que les facteurs génétiques et environnementaux, y compris le régime alimentaire et le mode de vie, peuvent contribuer au développement des maladies cardio-vasculaires, des cancers, et d'autres causes majeures de mortalité. Certaines études démontrent même que les facteurs environnementaux sont les plus importants dans la détermination et la prévention de pathologies. Par conséquent, les facteurs environnementaux peuvent certainement avoir plus d'influence sur l'espérance de vie et par conséquent sur la durée de vie (Willett, 2002; Vitetta et al., 2005).

2) Les protocoles anti-vieillissement

Les découvertes récentes dans le domaine du vieillissement indiquent que la durée de vie des êtres-vivants est plastique et peut être manipulée par des interventions génétiques, nutritionnelles ou pharmacologiques. De nos jours, les progrès dans la compréhension des mécanismes du vieillissement nous font poser la question de savoir si les interventions anti-âge qui permettraient de retarder le vieillissement et ses conséquences sont pertinentes et achevables. Les progrès réalisés en bio-gérontologie nous permettent aujourd'hui de répondre à cette question, par le biais de l'utilisation des modèles expérimentaux et par les protocoles anti-âge. Demain, il sera certainement possible, en supposant un succès continu dans la réduction de la morbidité liée à la vieillesse et de la mortalité, que l'on remette « à plus tard » le vieillissement humain, en maintenant encore pendant plusieurs décennies des fonctions physiologiques et comportementales correctes permettant l'autonomie de chaque individu.

a) Les interventions génétiques

Avec la découverte dans les années 1980 que des mutations dans des gènes uniques peuvent prolonger de manière significative la durée de vie chez le nématode (Klass, 1983), le

vieillissement a été considéré comme « malléable » selon la dimension génétique. Si le vieillissement est régi par des gènes spécifiques, alors des interventions génétiques visant ces gènes peuvent modifier son processus. Des centaines de gènes mutés peuvent accroître la longévité chez les nématodes, la levure, la drosophile et la souris. La plupart de ces mutations induisent une régulation de la croissance, du métabolisme énergétique, de la prise alimentaire et de la reproduction. Ces exemples incluent des gènes codant pour les composants de l'insuline, de l'insuline-like growth factor 1 (IGF-1), de la cible de la rapamycine (mTOR), et de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Dans la plupart des cas, l'extension de la durée de vie est observée lorsque l'activité du composant cible est diminuée ou inhibée. Ces stratégies génétiques permettent ainsi de réduire l'accumulation des dommages cellulaires et de favoriser la capacité des cellules à mobiliser des mécanismes de défenses (réparation, dégradation, résistance au stress…). Le fait que la durée de vie d'un organisme puisse être contrôlée de manière positive ou négative (activatrice ou inhibitrice) par certains gènes, encourage les chercheurs que les molécules impliquées dans ces mécanismes de régulation pourraient être les clés des interventions anti-âges (voir pour revue Vijg et Campisi., 2008).

b) L'exposition à des stress modérés : la théorie de l'Hormesis

L'application de la théorie de l'Hormesis dans un contexte anti-vieillissement est basée sur l'interprétation du vieillissement biologique comme une défaillance progressive de la dynamique et de l'homéostasie cellulaires. Le vieillissement est par ailleurs caractérisé par une accumulation progressive de dommages moléculaires au niveau des acides nucléiques (ADN, ARN, ARNmt), des protéines et des lipides. Diverses recherches faisant intervenir des traitements chimiques, physiques et/ou biologiques ont été menées pour comprendre les voies de réparation et de résistance mises en place par les cellules permettant d'améliorer leurs performances ainsi que leur survie (Figure 12). Plus précisément, les chocs thermiques, les irradiations (UV, rayons gamma, rayons X), les métaux lourds, l'alcool, l'exercice physique et les restrictions alimentaires (calorique, glycémique, protéiques…) ont été rapportés dans la littérature comme des facteurs de stress permettant d'induire un allongement de la durée de vie chez plusieurs modèles expérimentaux (Rattan, 2005). Les facteurs de stress hormétiques semblent agir sur les dommages induits sur les protéines par le stress oxydatif et sur l'agrégation de ces protéines en activant un/des mécanisme(s) cellulaire(s) intrinsèque(s) « anti-oxydant(s) » qui permet(tent) de maintenir la réparation des erreurs des acides nucléiques et la dégradation des protéines hautement endommagées. Ainsi les voies

hormétiques activent des protéines clés impliquées dans les réponses adaptatives au stress. De plus ces voies, induites par un facteur de stress, sont apparemment maintenues au cours de l'âge, sans diminution apparente (Rattan , 2005).

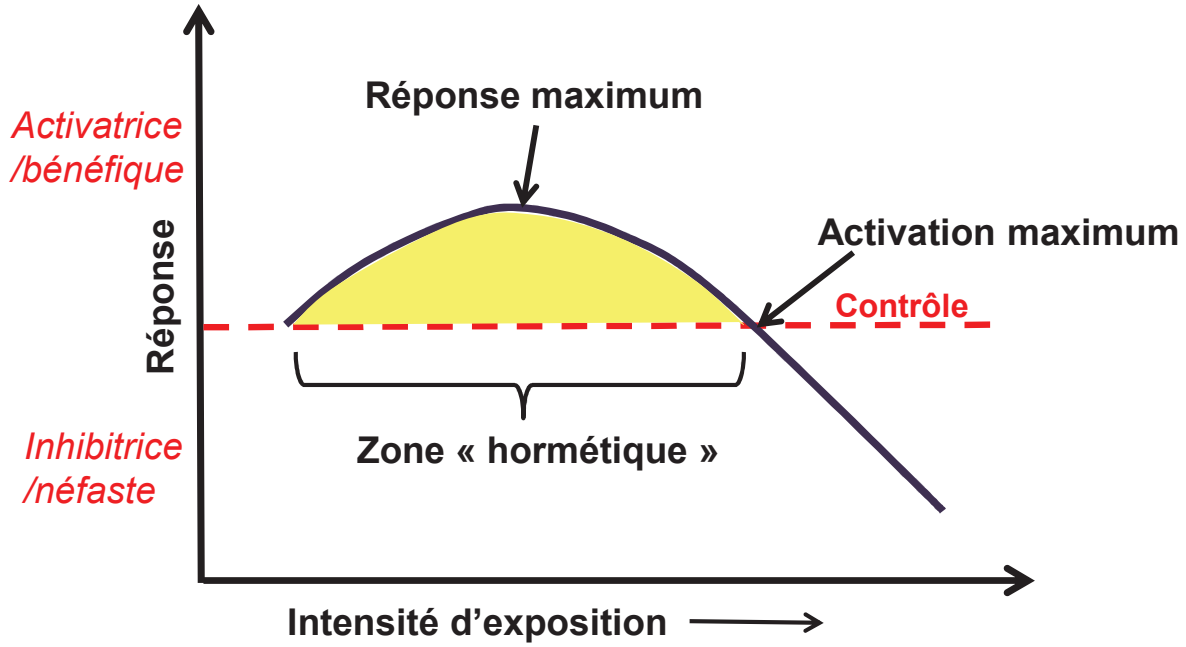


Figure 12. *Courbe de l'Hormesis. Graphique indiquant la courbe dose-réponse d'un traitement ayant un effet hormétique. Une faible dose induit des effets bénéfiques pour l'organisme traité alors que à un seuil donné, des doses trop élevées provoquent des dérèglements et des perturbations de l'organisme pouvant aller jusqu'à la mort (dose létale) (adapté de Cook et Calabrese., 2006).*

c) L'activité physique

Une activité physique adaptée permet de lutter contre la fonte musculaire liée à l'âge, de limiter l'augmentation de la masse grasse et de lutter contre le phénomène d'intolérance au glucose. Chez des populations « âgées » d'hommes et de femmes, des niveaux plus élevés d'activité physique ont été associés à une diminution des risques de mortalité et de perte de l'autonomie (déplacements, activités…) (de Groot et al., 2004). Récemment, Goto et Radak ont émis l'hypothèse qu'une activité physique régulière représente un stress modéré pour l'organisme induisant une cascade de régulations cellulaires favorables à l'organisme, autrement dit, l'exercice pourrait avoir des effets bénéfiques hormétiques via la fonction

mitochondriale (Figure 13) (Radak et al., 2008). Selon eux, il est donc probable que l'augmentation modeste de ROS par l'exercice peut activer des enzymes de défense et d'autres protéines contre le stress oxydatif cellulaire et tissulaire, tels que les muscles, qui seraient alors préparés à des productions excessives de ROS (Reactive Oxygen Species). Une telle « adaptation » permettrait aux cellules de faire face à des contraintes plus fortes de manière durable dans le temps (voir pour revue Goto et al., 2007).

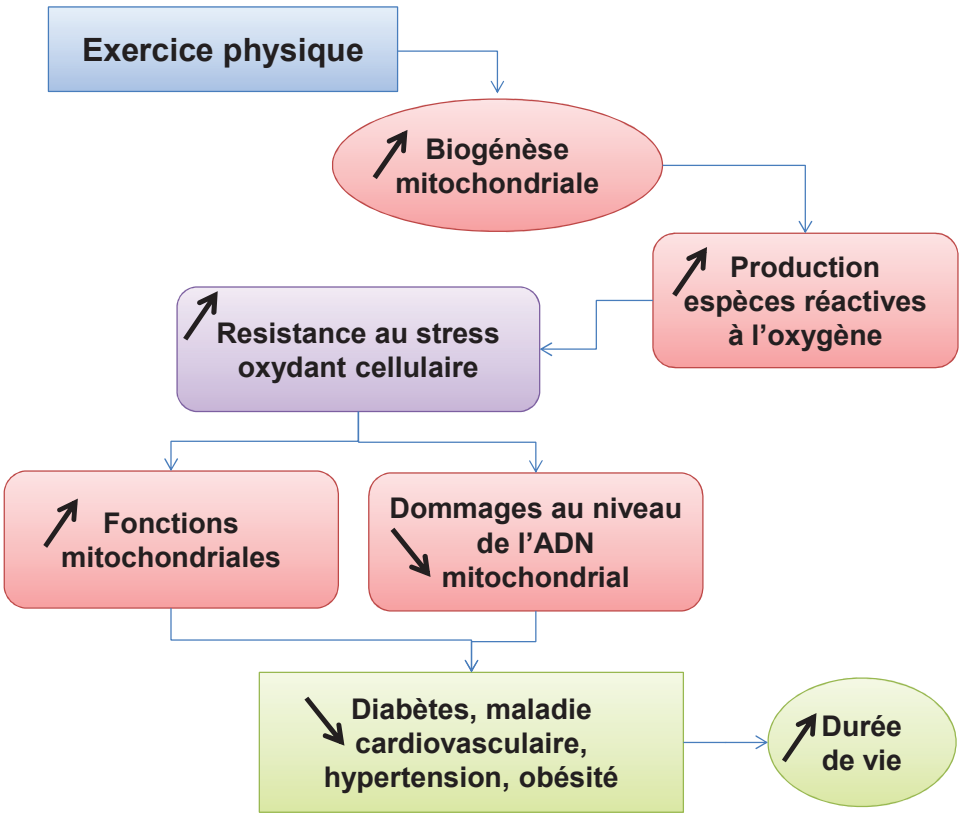


Figure 13. *Schéma des effets bénéfiques hormétiques selon la théorie de Goto et Radak (2005, revue dans 2007).*

Par ailleurs, l'activité physique a également été associée à une mortalité globale réduite ainsi qu'à une diminution de la fréquence d'apparition de maladies cardiovasculaires et de cancers (Knoops et al., 2004). L'association positive entre activité physique et mortalité a été retrouvée dans des populations avec des distributions d'âges différents et dans différentes zones géographiques (Woodcock et al., 2011). A l'opposé, un faible niveau d'activité physique accompagné d'un niveau élevé de comportements sédentaires n'est pas lié à une mortalité prématurée (Stamatakis et Hamer, 2011). De plus, la capacité cardiorespiratoire, est considérée comme un bon indicateur de la proportion (ou quantité) d'activité physique d'un

individu. Cette caractéristique physiologique est une mesure objective de la capacité physique d'un individu et est fortement liée à une mortalité réduite (toutes causes confondues) et à une diminution des maladies cardio-vasculaires (Kodama et al., 2009).

d) L'hormonothérapie

Le vieillissement est caractérisé par une diminution progressive de la synthèse des hormones ainsi qu'un déclin du nombre de récepteurs cellulaires hormonaux. Les personnes âgées présentent des concentrations plus faibles de la plupart des hormones en comparaison à de jeunes adultes (Hertogue, 2005). Une multitude de publications a décrit les divers déficits hormonaux qui apparaissent avec l'âge. Pour citer des exemples : les taux de l'hormone de croissance (growth-hormone ; GH), de l'insuline like growth factor-1 (IGF-1), de la mélatonine (hormone du cycle veille-sommeil), des hormones thyroïdiennes (T3, T4), de la déhydroépiandrostérone (DHEA), des œstrogènes et de la testostérone diminuent progressivement à partir de l'âge adulte. Ces déficits hormonaux ne sont pas seulement limités à la ménopause, l'andropause ou la somatopause (déficience en hormone de croissance), ils sont également impliqués dans les perturbations métaboliques, telles que l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type II (Pasquali et Gambineri, 2006), l'ostéoporose (Jochems et al., 2005) ou bien encore dans certains types de cancers (Sonntag et al., 2012). Par ailleurs, une diminution des hormones de croissance GH et IGF-1 permet d'augmenter la longévité chez les souris (Bartke, 2011). Pourtant chez l'Homme, des taux relativement faibles d'IGF-I ont été associés à un risque accru de pathogenèses telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète, alors que des concentrations élevées ont été associés à un risque accru de développer un cancer (Juul, 2003). Il a d'ailleurs été démontré par le biais de mutations séléctives que ce sont les récepteurs cérébraux de l'IGF-1 (IGF-1R) qui modulent la croissance et la longévité chez la souris (Kappeler et al., 2008).

Les traitements biomédicaux ont réussi dans certains cas à enrayer l'appauvrissement en hormones, tandis que les recherches « anti-vieillissement » se concentrent sur les déficiences légères, modérées et/ou sévères (Anton et al., 2005). L'administration de l'hormone de croissance permet d'augmenter la masse maigre et de réduire les effets du vieillissement sur la peau. Chez l'animal, l'administration de DHEA induit une amélioration des fonctions mnésiques. Ce n'est que récemment que les recherches dans le domaine de « l'endocrino-senescence » ont réussi à affiner les traitements hormonaux en tenant compte de l'âge, du sexe, des niveaux d'hormones libres ou biodisponibles par rapport à des niveaux

d'hormones liées, et des ratios avec les principaux antagonistes des hormones pour ajuster le traitement à l'échelle individuelle et perturber le moins possible l'homéostasie ; c'est le cas par exemple pour l'insuline ou les hormones thyroïdiennes. Par ailleurs, le traitement hormonal substitutif chez la femme ménopausée a montré un impact bénéfique sur certains aspects du vieillissement par son action sur le squelette, la peau, les organes urogénitaux, le cerveau mais a parallèlement montré une augmentation de la fréquence d'apparition de cancers chez certains sujets.

e) Les interventions nutritionnelles

De mauvaises pratiques nutritionnelles pendant l'enfance ont des répercussions négatives sur l'organisme à l'âge adulte et induisent une augmentation du risque de pathologies dont l'obésité (Jackson 2005). L'obésité chez les humains est d'ailleurs significativement associée à un risque accru de maladies chroniques : diabète de type II, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, cardiomyopathies, cancers et peut se traduire à long terme par une accélération du vieillissement et une baisse significative de l'espérance de vie. A l'inverse, une étude a confirmé que de bonnes pratiques alimentaires comme l'adoption d'un régime méditerranéen traditionnel (céréales complètes, légumes, poissons, fruits, huile d'olive) est associé à une réduction significative de la mortalité toutes causes confondues (Trichopoulou et al., 2003). Meyer et ses collègues ont démontré que l'association d'un régime alimentaire appauvri en calorie et couplé à un régime de type méditerranéen est bénéfique pour la santé cardiaque (Padi et al., 2011). Ces pratiques nutritionnelles peuvent servir à accroître la durée de vie parallèlement à un maintien des fonctions de l'organisme et à un retard d'apparition de pathologies. L'utilisation de composés alimentaires « bioactifs » (nutriments et composés phytochimiques présents dans les fruits, légumes et épices) à des doses pharmacologiques apparaissent comme une approche thérapeutique potentielle pour traiter les dérèglements métaboliques dans le cadre d'étude sur le vieillissement notamment. Ces composés alimentaires, que l'on peut consommer quotidiennement, peuvent efficacement réduire les dommages cellulaires liés au stress oxydant, les déséquilibres inflammatoires et apoptotiques via la régulation des voies métaboliques (Aggarwal, 2010). Par ailleurs, dans le domaine des interventions nutritionnelles anti-âge, la restriction calorique (RC) introduite pour la première fois en 1935 par McCay lors de ses travaux sur les rats, a été montrée depuis, efficace dans l'augmentation de la durée de vie et la réduction de pathologies liées à l'âge de

plusieurs espèces animales par rapport à des conditions d'alimentation *ad libitum* (AL) (voir pour revue, Smith et al., 2010).

Le vieillissement induit donc une diminution globale de l'aptitude des organismes plus ou moins marquée suivant les environnements qu'ils occupent. Ce déclin est progressif et les signes d'un dysfonctionnement majeur apparaissent plutôt après 60 ans. Ceci offre la possibilité d'intervenir précocément et d'améliorer les capacités fonctionnelles générales de l'individu, résultant en une durée de vie accrue. De multiples interventions ont fait l'objet d'un grand nombre d'études et ont démontré des capacités à limiter le vieillissement et ses conséquences. Elles présentent toutes des effets plus ou moins bénéfiques sur ce processus mais toutes ne sont pas applicables à l'Homme. En effet, malgré l'efficacité des paradigmes génétiques menés chez les modèles unicellulaires et invertébrés, il paraît inenvisageable aujourd'hui de mener de front de telles recombinaisons génétiques chez l'Homme. La pratique d'exercice physique régulier ou l'exposition à des stress modérés par des facteurs hormétiques induisent des effets bénéfiques sur l'organisme de divers modèles en augmentant notamment leur durée de vie. Cependant, ces effets peuvent être limités ou réversibles à moyen terme, ne tenant pas forcément leurs promesses anti-âge chez l'Homme par exemple. Le développement de protocoles alimentaires modulant le vieillissement et ses effets semble être plus robuste et plus efficace que ceux précédemment cités. Finalement, la restriction calorique modérée et chronique semble présenter de nombreux avantages chez différentes espèces et plus particulièrement chez l'Homme comme le démontrent les études chez les habitants d'Okinawa. Afin d'évaluer le potentiel, les bénéfices et les limites d'une telle intervention anti-âge, un constat préalable chez les modèles expérimentaux de la restriction calorique est primordial.

IV) La restriction calorique

Ce n'est qu'en 1935 qu'une première étude chez le rat, menée par McCay et ses collègues, met en évidence qu'une restriction calorique de 40 % à partir du sevrage entraîne une augmentation de l'espérance de vie chez les animaux restreints (McCay et al,. 1935) (Figure 14). Les conclusions de cette étude ont agi comme un véritable promoteur et de nombreuses études ont alors vu le jour chez d'autres espèces animales, révélant des effets similaires sur la longévité des animaux ainsi que sur le retard d'apparition de pathologies liées à l'âge et sur le maintien des fonctions biologiques de l'organisme.

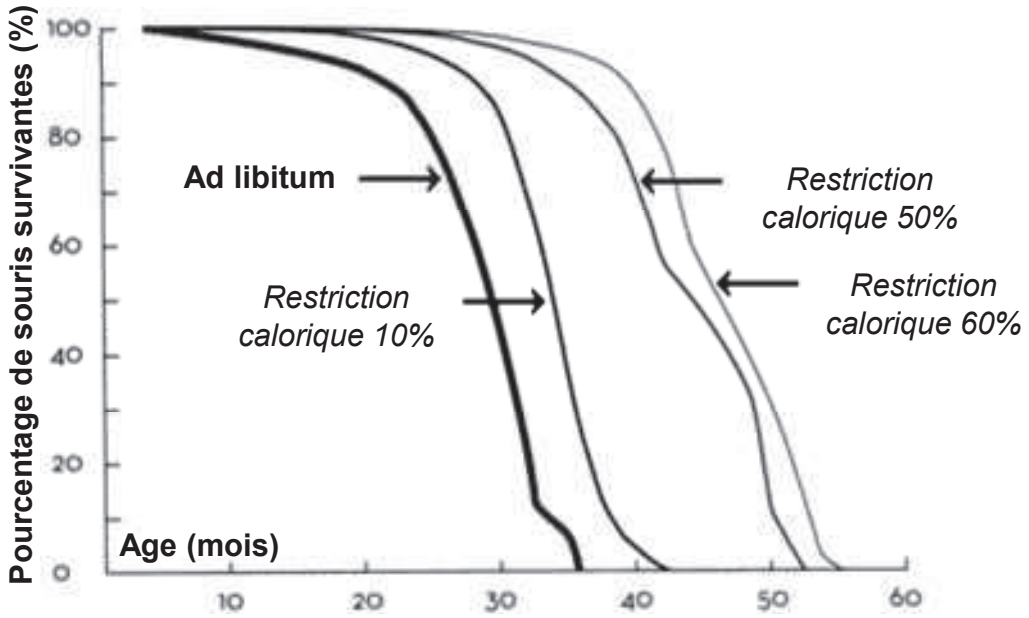


Figure 14. . *Restriction calorique et survie chez la souris. Pourcentage de souris survivantes lorsqu'elles sont soumises à un régime standard Ad libitum, à une restriction calorique de 10%, à une restriction calorique de 50% ou à une restriction calorique de 60%. Plus la restriction calorique appliquée est importante et plus le taux de survie des souris restreintes est accrue (adapté de Weindruch et al., 1986).*

Cependant bien que des termes différents soient utilisés pour nommer la diminution de l'apport calorique, il est important de définir ici la restriction calorique (RC) comme elle est utilisée dans notre étude. Il s'agit d'une diminution de la prise alimentaire mais sans malnutrition, c'est-à-dire sans induire d'excès ou de carence pour un nutriment donné, autrement dit l'abaissement calorique doit concerner l'ensemble des nutriments du régime alimentaire de « base ». Chez l'animal, la méthode la plus répandue pour instaurer une RC

nécessite d'abord de mesurer la prise alimentaire individuelle des animaux lorsqu'ils sont nourris *ad libitum*, c'est-à-dire lorsque la ressource alimentaire est disponible à volonté jusqu'à satiété, l'apport calorique étant ensuite individuellement abaissé d'un pourcentage précis variant de 30 à 60% (Canto et Auwerx, 2009). Cette intervention nutritionnelle est aujourd'hui considérée comme la seule manipulation non génétique capable d'augmenter la longévité chez plusieurs espèces animales. De l'organisme unicellulaire aux mammifères, de nombreux taxons sont utilisés comme supports aux études de la RC (Roth et al., 2007).

Les données actuelles invitent à émettre l'hypothèse que des espèces différentes répondent de manière similaire à une diminution plus ou moins importante des disponibilités alimentaires en allongeant leur durée de vie. Cela suggère que les réponses de l'organisme lors d'une RC dépendent d'un ou de mécanisme(s) également impliqué(s) dans la « lutte » contre le vieillissement, partagé(s) par des espèces provenant de différents ordres.

Selon cette hypothèse, la RC pourrait améliorer la qualité de vie et augmenter la longévité de l'espèce humaine. Bien que quelques données rapportent des effets bénéfiques chez l'Homme, les études sur des sujets humains sont plutôt rares au vue de la longévité de notre espèce. Nous connaissons l'exemple des habitants de l'île d'Okinawa (Japon), qui présentent la plus longue espérance de vie (86 ans pour les femmes et 78 ans pour les hommes) ainsi que le plus grand nombre de centenaires : 400 centenaires pour une population de 1,3 million d'habitants, soit 34 centenaires par 100 000 habitants contre 11 par 100 000 habitants en France par exemple (The Okinawa Centenarian Study, Suzuki et al., 2010). Les habitants de cette île vieillissent en « bonne santé » et l'occurrence de pathologies chroniques telles que le diabète ou les cardiopathies est extrêmement faible. Ils vivent plus longtemps en pleine possession de leurs moyens ; leurs performances restant plus longtemps à un état « jeune ».

1) Effets physiologiques de la restriction calorique chez différentes espèces

a) Chez les invertébrés

Chez la levure, la RC a été l'objet de nombreuses études alimentant le savoir sur les mécanismes cellulaires de l'impact de la RC sur la longévité. La levure soumise à une RC est capable de passer de son état physiologique basal de fermentation à un état physiologique utilisant la respiration mitochondriale (aérobie) qui permet aux cellules de doubler leur durée de vie chronologique. La respiration mitochondriale est impliquée dans l'activation de

certains facteurs de longévité comme les sirtuines (Silent mating type Information Regulation two protein), famille d'enzymes (désacétylases d'histone Nicotinamide Adénine Dinucléotide -dépendantes) conservée au cours de l'évolution. Les sirtuines sont associées à de nombreux changements physiologiques qui contribuent notamment à augmenter la survie d'un individu. Des réductions modérées basées sur la concentration de glucose dans le milieu de culture des cellules (avec une concentration optimale de glucose dans le milieu de 2% qui diminue à 0.5% ou 0.05%) impactent la régulation des voies métaboliques en diminuant par exemple la sensibilité à certains nutriments et permettent d'augmenter les durées de vie chronologique et réplicative, par le biais d'une sirtuine (Sir2, silent information regulator 2) (Lin et al., 2004). La capacité de Sir2 à allonger la durée de vie chez la levure, dépend en partie de son rôle de stabilisation dans la configuration de la chromatine de certaines régions répétitives de l'ADN.

Actuellement, la majorité des études sur la RC a porté sur l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, des levures capables d'utiliser la fermentation et la respiration. Mais, actuellement, les recherches s'orientent vers des modèles ne pouvant utiliser le « basculement » entre la fermentation et la respiration mitochondriale tel que *Candida albicans*. Ces modèles sont susceptibles d'apporter des informations supplémentaires quant aux mécanismes de base impliqués dans l'augmentation de la longévité chez des organismes restreints.

Chez le ver nématode, *Caenorhabditis elegans*, les différentes méthodes de RC énoncées précédemment augmentent la longévité (Vanfleteren et al., 1999). La régulation de l'expression des sirtuines est également mise en jeu dans ce processus chez *C. elegans*, puisque des manipulations génétiques de la chaîne des sirtuines (surexpression (Tissenbaum et Guarente, 2001), mutation (Wang et al., 2006)) entraînent une augmentation de la durée de vie significative chez cette espèce.

Chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*, la RC appliquée à une souche sauvage augmente la longévité en ralentissant le processus de vieillissement normal. Par analyses comparatives du transcriptome chez les drosophiles restreintes, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme, la croissance cellulaire et la reproduction a été observée (Pletcher et al., 2002). Cet allongement de durée de vie requière l'activation d'une sirtuine, dSir2 (Guarente et Picard, 2005). Une intervention génétique visant à diminuer dSir2 bloque complètement les voies cellulaires de régulation impliquées dans l'augmentation de la durée de vie (Rogina et Helfand, 2004).

Les méthodes de RC influent également sur le pourcentage d'augmentation de la durée de vie. Ainsi, rapportée au nombre de calories, une réduction de la consommation d'acides aminés augmente de façon bien plus marquée la longévité des drosophiles comparée à une réduction de la quantité de sucre dans le milieu nutritif d'élevage. De même, des mutations au niveau de gènes spécifiques impliqués dans l'extension de la durée de vie chez cette espèce (comme le gène codant pour le récepteur à l'insuline CHICO), ne présentent pas d'effet « additif » sur l'augmentation de la durée de vie lorsque les individus sont également sous RC (Clancy et al., 2002). Récemment, de nouveaux gènes ont été identifiés, qui pourraient jouer un rôle clé dans la voie de régulation de la longévité en intervenant au niveau de la prolifération cellulaire et en régulant la voie insuline/IGF-1 (voir pour revue, Tchkonia et al., 2010).

b) Chez les rongeurs

Les rongeurs ont été les premiers modèles à servir pour les études de la RC et plus précisément les études sur l'induction et l'activation des sirtuines fortement pressenties comme acteur principal dans l'augmentation de la longévité. SIRT1 est la plus étudiée des sept sirtuines présentes chez les mammifères (SIRT1-SIRT7). C'est également la sirtuine qui partage le plus de séquences similaires avec la sirtuine Sir2 présente chez la levure (Frye, 2000). SIRT1 intervient dans de nombreuses cascades de régulation cellulaire en déacétylant un grand nombre de facteurs et cofacteurs de transcription impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire, la résistance au stress oxydant et la régulation du métabolisme (Weindruch et al., 2002 ; Brunet et al., 2004). SIRT1 est également un régulateur de PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha) (Rodgers et al., 2004), un activateur de transcription qui joue un rôle majeur dans la biogenèse mitochondriale ainsi que l'adipogenèse et le métabolisme énergétique dans la majorité des tissus. Récemment, une étude a montré que SIRT1 prend part à la régulation transcriptionelle circadienne de certains gènes clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) rendant possible un lien entre la longévité et les rythmes circadiens (Nakahata et al., 2008). De nombreuses évidences ont démontré le lien entre l'activation de SIRT1 et les effets bénéfiques de la RC sur la longévité (voir pour revue, Cohen et al., 2004). SIRT6 a également été démontrée comme médiateur des effets positifs de la RC comme par exemple la diminution de l'incidence des troubles liés à l'âge dans les tissus spécifiques tels que les reins, le cerveau et le cœur (Kanfi et al., 2008). Une déficience en SIRT7 chez les souris entraîne une

diminution de l'espérance de vie moyenne et maximale, induisant également des cardiomyopathies sévères (Vakhrusheva et al., 2008). Cependant SIRT1 reste le principal lien entre la RC et la longévité, la RC étant responsable de l'augmentation de SIRT1 dans la plupart des tissus chez les rongeurs (Cohen et al., 2004).

La RC induit une diminution de l'adipogenèse et stimule la mobilisation des acides gras libres au niveau des adipocytes via SIRT1 (Picard et al., 2004). Elle induit également la gluconéogenèse dans les cellules hépatiques (Rodgers et al., 2005). Chez les souris sous RC, SIRT1 semble également avoir un rôle neuro-protecteur (Qin et al., 2005). Par ailleurs, de nombreuses études soutiennent l'hypothèse selon laquelle les effets bénéfiques de la RC sont régis par la voie d'action GH/IGF-1, aussi appelée voie de l'insuline. En particulier, une réduction du signal IGF-1 pourrait être responsable d'une diminution d'apparition de mutations spontanées et de tumeurs du rein et de l'intestin grêle chez des rats déficients en GH (Shimokawa et al., 2003). De même, la RC augmente considérablement la sensibilité à l'insuline et atténue la formation et le dépôt de plaques β-amyloïdes chez un modèle de souris transgénique de la maladie d'Alzheimer (Patel et al., 2005). Les effets de ce régime alimentaire ont également été testés sur les fonctions cognitives des rongeurs mais les résultats sont fortement discutés. Ainsi, des effets positifs de la RC ont été observés chez des souris placées dans différents dispositifs faisant appel à la mémoire de travail (test d'alternance spontanée) ou à la mémoire spatiale (piscine de Morris) sans modification des comportements exploratoires évalués grâce à l'utilisation du test en champ ouvert (Wu et al., 2003). De plus, des effets sexe-dépendants ont été mis en évidence. En effet, dans une étude comparant l'effet de la RC en fonction du sexe des animaux, seuls les mâles ont démontré une augmentation de leurs performances cognitives. A l'inverse, des rats placés sous RC pendant une grande partie de leur vie ne présentent aucune amélioration de leurs performances de mémoire de travail (Markowska et al., 1999). Cependant, le pourcentage élevé de RC utilisé dans cette étude (60%) pourrait peut-être expliquer l'absence d'augmentation de leurs performances cognitives. En effet, le glucose étant la source principale d'énergie dans le cerveau, une RC trop élevée et à long terme peut avoir un impact sur le métabolisme cérébral du glucose induisant un déclin des performances. Quelques années plus tard, Yanai et ses collaborateurs (2004) ont renforcé les résultats de Markowska en démontrant, chez des rats également, que la RC pouvait même induire des effets délétères sur les capacités de mémorisation spatiale et de travail (Yanai et al., 2004). Pour le moment, le débat sur l'impact d'un tel régime sur les fonctions cérébrales reste ouvert et de plus amples investigations sont nécessaires pour apporter des conclusions solides. Enfin, le pool génétique d'une lignée peut

affecter les effets de la RC sur la longévité. Une étude récente a évalué la longévité chez des souris de 42 lignées génétiques différentes soumises ou non à une RC. De manière surprenante, la RC n'augmente la longévité des souris que dans 9 lignées et la diminue dans 4 autres, les 29 autres lignées ne présentant pas de différences selon le régime alimentaire (Rikke et al., 2010).

c) Chez les primates non-humains

Les études chez les PNH se sont multipliées en raison des découvertes importantes obtenues grâce à l'utilisation des précédents modèles animaux. Il y a environ 25 ans, deux études ont débuté à l'Institut National du Vieillissement (Baltimore, USA) et à l'université du Wisconsin (Madison, USA) (voir pour revue, Ingram et al., 1990 ; Roth et al., 1999) chez des macaques rhésus (*Maccaca mulatta*) placés sous une RC de 30% à partir de l'âge adulte (environ 10 ans chez cette espèce) (Roth et al., 1999). A partir de l'âge de 20 ans environ, le pourcentage de survie des macaques contrôles décline plus rapidement que celui des macaques sous RC. Après 15 ans de traitement, les macaques restreints présentent un taux de survie supérieur de 20% par rapport à celui des témoins (Colman et al., 2009) (Figure 15).

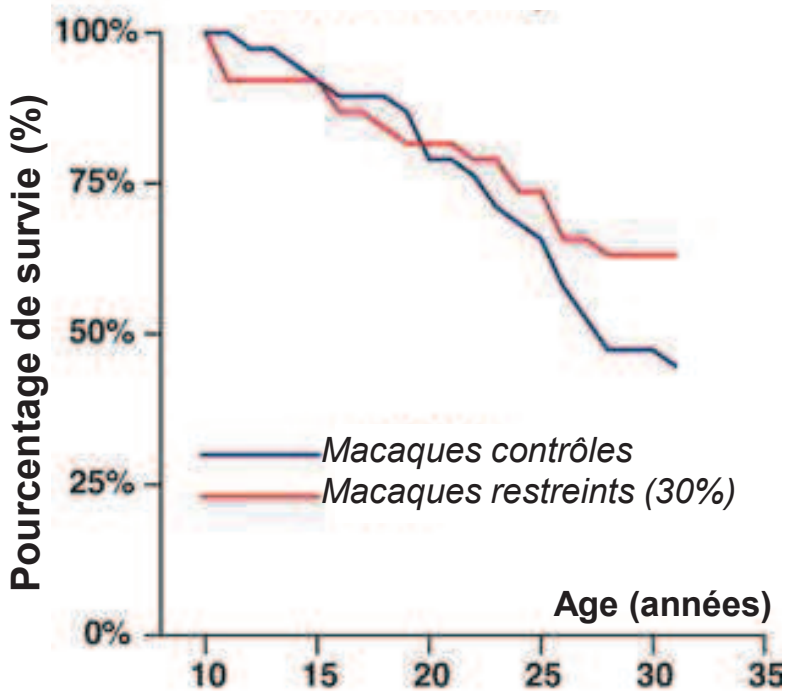


Figure 15. *Restriction calorique et survie chez le macaque rhésus. Pourcentage de macaques rhésus survivants lorsqu'ils sont soumis à un régime standard (macaques contrôles) ou à une restriction calorique de 30%. (adapté de Colman et al., 2009).*

La fréquence d'apparition de diabètes de type II et de maladies cardio-vasculaires est 50% plus basse chez les animaux en RC comparés aux animaux contrôles dont la moitié a développé des états pré-diabétique ou diabétique (Colman et al., 2009) (Figure 16). Tout comme chez les rongeurs, les macaques sous RC ont présenté des adaptations structurales, hormonales et métaboliques (Kemnitz et al., 1994). Il a été observé une diminution importante de la masse grasse des animaux, une sensibilité à l'insuline plus importante ainsi qu'une diminution des dommages causés par les radicaux libres (Lane et al., 1995) et des processus inflammatoires (Branch-Mesetal et al., 2008). De plus, le déclin lié à l'âge des fonctions immunitaires (Ebersole et al., 2008), de même que l'atrophie cérébrale de la matière grise et l'apparition de sarcopénie ont également été atténués chez les animaux exposés à une RC (Colman et al., 2008 ; Colman et al., 2009 ; Willette et al., 2012).

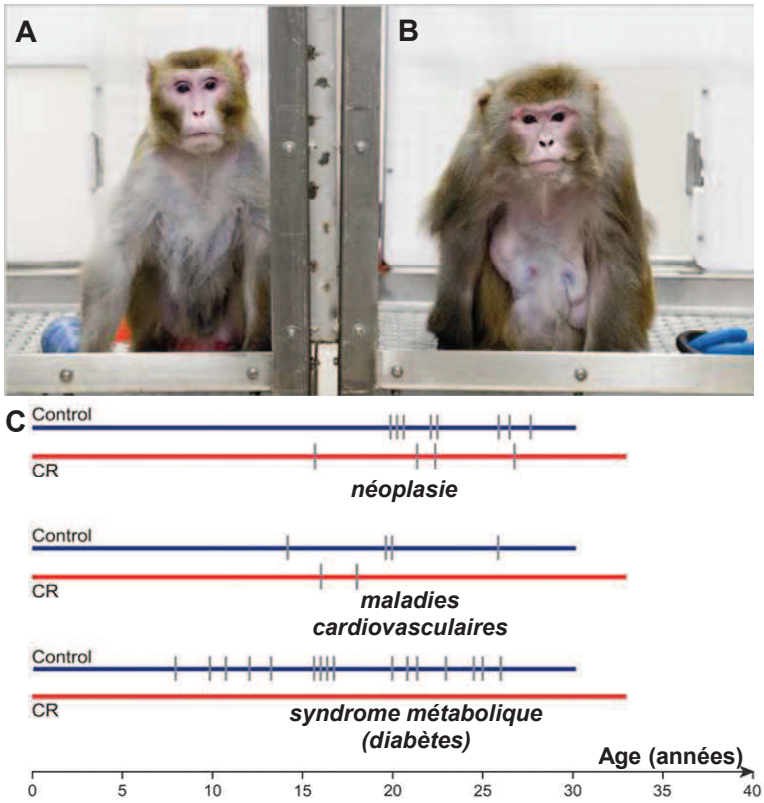


Figure 16. *Modifications morphologiques d'un macaque rhésus soumis à une restriction calorique de 30% (A) et d'un macaque rhésus non restreint et nourri avec un régime standard (B). C : évolution de la fréquence d'apparition de trois types de pathologies liées à l'âge chez le macaque rhésus : les néoplasies (tumeurs bénignes ou non), les maladies cardiovasculaires et les dérèglements du métabolisme glycémique (syndrome métabolique et diabète de type II) (adapté de Colman et al., 2009).*

Comparés aux animaux contrôles du même âge, les primates restreints présentent une masse corporelle plus faible, avec une masse grasse réduite mais également une température corporelle diminuée (Lane et al., 1996). Cependant, l'impact de la RC sur les fonctions reproductrices des primates est moins clair. Chez le macaque rhésus, comme chez le rat, la RC retarde la puberté et il semblerait qu'elle freine la croissance osseuse des animaux restreints (Black et al., 2001 ; Sitzman et al., 2010). Enfin, l'impact d'une RC a été évalué sur le raccourcissement des télomères chez des macaques. Le rôle du raccourcissement des télomères dans le vieillissement cellulaire est bien connu, et chez l'Homme, des données épidémiologiques ont démontré que la longueur des télomères dans les leucocytes était extrêmement variable à la naissance mais inversement corrélée à l'âge. Chez les macaques, aucun effet de la RC sur la longueur des télomères n'a pu être encore mis en évidence (Smith et al., 2011).

d) Chez l'Homme

Chez l'Homme, une RC modérée (25%) de 3 à 6 mois s'accompagne d'effets bénéfiques marqués contre l'obésité, la résistance à l'insuline, les mécanismes inflammatoires, le stress oxydatif ou les dysfonctionnements cardiovasculaires (Dolinsky et Dick, 2011 ; Weiss et Fontana, 2011), résultats en accord avec ceux obtenus chez des rongeurs subissant le même traitement (Rippe et al., 2010). Comme chez les rongeurs, des modifications hormonales sont observées chez l'Homme sous RC, comme une augmentation de l'adiponectine, une réduction de la triiodothyronine (hormone thyroïdienne impliquée dans la régulation du métabolisme), une baisse des taux de testostérone et d'insuline. La RC permet aussi de diminuer un certain nombre de facteurs de risque impliqués dans le développement de maladies cardio-vasculaires comme le taux de cholestérol, la quantité de protéine C-réactive qui a un rôle important dans les réponses inflammatoires, la pression sanguine et l'épaisseur de l'intima-média de l'artère carotide (Weiss et Fontana, 2011). Ce régime alimentaire diminue également la température corporelle des individus sous RC. Enfin, il induit des adaptations métaboliques et comportementales avec une baisse du niveau d'activité physique chez des volontaires placés sous RC pendant 6 mois (Redman et al., 2011). Il est intéressant de noter qu'il existe des différences majeures dans les effets de la RC chez les primates comparés à ceux observés chez les rongeurs. Par exemple, une RC modérée induit une diminution de 30 à 40% du taux d'IGF-1 plasmatique chez les rongeurs mais aucun effet n'a encore été observé chez l'Homme (Fontana et al., 2008).

Dans l'étude « Baltimore Longitudinal Study of Aging » (BLSA), une RC modérée et à long terme (6 ans en moyenne), induit une diminution de la température corporelle moyenne de jour et de nuit (Soare et al., 2011), fait également démontré chez des rats restreints (Duffy et al., 1989) et chez des macaques rhésus soumis à une RC de 30% (Lane et al., 1996). Par ailleurs des essais cliniques d'application d'une RC chez des patients en chimiothérapie ont montré des résultats encourageants (Raffaghello et al., 2010). En effet, la diminution d'un grand nombre d'effets secondaires liés à la thérapie ainsi qu'une possible augmentation de son efficacité ont été observées chez des patients soumis à des jeûnes répétés pendant leur chimiothérapie.

2) Certaines limites à l'utilisation de la restriction calorique

La RC s'accompagne d'un grand nombre de modifications physiologiques ou comportementales, à l'échelle de la cellule et à l'échelle de l'organisme entier. Et malgré un nombre croissant d'études à ce sujet, une majorité de modifications aussi minimes soient-elles nous échappent encore tant par leur signification que par leurs conséquences sur le reste de l'organisme. En effet, même si la RC présente certains effets bénéfiques, elle pourrait également altérer certaines fonctions physiologiques essentielles pour l'organisme telles que la réponse immunitaire, les capacités de mémorisation, les capacités de reproduction ou les mécanismes de cicatrisation et de réparation de lésions, probablement en raison d'une diminution des ressources énergétiques (plus ou moins sévères et à plus ou moins long terme). Par exemple, la cicatrisation de plaies cutanées est réduite chez des rats placés en RC de 40%, cicatrisation qui peut être considérablement améliorée si les rats restreints sont nourris *ad libitum* 48h avant de subir une légère coupure au niveau de leur peau (Hunt et al., 2011). Des effets négatifs de la RC ont également été reportés chez les rongeurs pour la résistance au stress ou aux infections provoquées par des bactéries, des virus ou des vers, même s'il est vrai que la RC permet de ralentir le déclin lié à l'âge de certaines fonctions immunitaires. Chez les primates, ces inconvénients sur l'augmentation de la sensibilité aux infections par des pathogènes ou sur les processus de cicatrisation n'ont pas encore été étudiés. Chez les macaques, la RC à long terme possède des effets négatifs sur la minéralisation osseuse (Kemnitz, 2011) ainsi que sur l'axe neuroendocrine de la reproduction (Sitzman et al., 2010). Chez l'Homme aussi des effets délétères de la RC ont été rapportés, comme par exemple, une diminution de la densité osseuse (Riedt et al., 2009). Finalement, malgré tous les avantages que peut apporter le fait de diminuer notre prise alimentaire, nous n'avons pas encore toutes

les connaissances nécessaires pour développer et appliquer des protocoles de RC adaptés au long terme chez l'Homme et être sûr de l'innocuité d'un tel régime sur l'organisme. En plus de certains effets délétères non négligeables provoqués par une RC à long terme, un tel traitement apporterait beaucoup de contraintes pratiques et sociales dans nos sociétés occidentales.

La corrélation négative entre le nombre de calories ingérées et l'augmentation de la durée de vie observée chez différentes espèces suggère deux hypothèses. Premièrement, les facteurs clés de régulation de la balance énergétique jouent un rôle très important dans les mécanismes engendrés par la restriction calorique, en induisant un « shift » bénéfique du métabolisme en réponse à une diminution des ressources énergétiques. Deuxièmement, les voies impliquées dans les effets de la RC semblent être similaires entre les différents modèles étudiés, suggérant ainsi la conservation à la fois de molécules et de voies de signalisation cellulaire majeures au cours de l'évolution des espèces. La pertinence de ces résultats et leur application directe à l'Homme dépendent de la conservation des effets de la RC sur le vieillissement chez les primates non-humains. Les études menées chez des macaques rhésus placés en RC à partir de l'âge adulte semblent confirmer les résultats obtenus chez les modèles unicellulaires, invertébrés et rongeurs. De ce fait, il est envisageable de prévoir des effets similaires de la RC à long terme chez l'Homme dans des conditions d'études du vieillissement normal ou pathologique. Cependant, en raison des contraintes imposées par ce type de régime et certains effets potentiellement néfastes mis en évidence chez plusieurs organismes dont l'Homme, les recherches actuelles dans le domaine de la bio-gérontologie moderne s'orientent plutôt vers un contournement des limites de la RC en développant et validant des molécules qui présenteraient et mimeraient les effets bénéfiques de la RC en contournant les effets potentiellement délétères d'un tel régime.

V) Mimer les effets de la restriction calorique

La découverte que la restriction calorique régule et induit un certain nombre de voies de signalisation cellulaire, a permis de pointer le doigt sur certaines de ces molécules. Ainsi la recherche sur le vieillissement s'est tournée sur l'isolement des « acteurs » de la restriction calorique, afin de pouvoir en tirer les bénéfices sans avoir les inconvénients de la restriction à long terme.

1) Les mimétiques de la restriction calorique: définition et exemples

Même si la RC appliquée chez des sujets humains présente un grand nombre d'effets bénéfiques, il n'est guère envisageable de pratiquer sur le long terme les réductions d'apports alimentaires de 30-40% qui sont pourtant nécessaires pour obtenir des résultats positifs. Une approche alternative à la RC est donc aujourd'hui d'une grande nécessité. Le terme et le concept de mimétiques de la RC ont vu le jour à la fin des années 90. Depuis son introduction, les recherches de mimétiques de la RC ne cessent d'augmenter. Roth et son équipe ont proposé une définition de mimétique de la RC : « *composé qui mime les effets métaboliques, hormonaux et physiologiques de la RC, active des voies d'actions similaires, améliore la résistance au stress oxydant, augmente la longévité, retarde l'apparition des pathologies liées à l'âge et maintient les fonctions de l'organisme dans un état jeune, sans réduire l'apport calorique* » (Roth et al., 2005). Plusieurs composés candidats répondent à cette définition et actuellement trois d'entre eux attirent l'attention des scientifiques : les inhibiteurs glycolytiques, certains gènes spécifiques et les polyphénols.

a) La metformine

La metformine est extraite d'une plante, *Galega officinalis*, que nous appelons plus communément lilas. Cette molécule a été initialement isolée et développée dans les années 1950 pour le traitement des troubles du métabolisme glycémique, particulièrement l'hyperglycémie et le diabète de type II (Bailey et Day., 2004). En plus de son utilisation chez les personnes diabétiques, la metformine est également employée comme agent anti-viral et anti-cancéreux (voir pour revue Dowling et al., 2011). Au niveau cellulaire, la metformine active l'AMPK (Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase : un capteur d'énergie impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire), ce qui conduit à une diminution de la synthèse d'ATP au niveau des mitochondries et à une augmentation de l'AMP cellulaire. Ces deux actions conduisent à la stimulation des processus cataboliques de l'ATP tel que la glycolyse, à l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique et à la stimulation de la captation du glucose par le muscle (Hundal et al., 2000). En résumé la metformine mime les effets bénéfiques de la restriction calorique en améliorant la sensibilité à l'insuline et en régulant le métabolisme énergétique cellulaire.

b) L'AMPK

L'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), une protéine kinase activée par l'AMP, a émergé au cours des dix dernières années comme un mécanisme clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire en tant que médiateur essentiel de la régulation de certaines hormones du métabolisme (insuline, leptine, ghréline, adiponectine…) (Steinberg et Kemp, 2009). Cette molécule est également au centre des recherches concernant les mimétiques des effets bénéfiques de la RC vu son rôle dans la balance énergétique. Une activation pharmacologique de l'AMPK améliore à la fois la sensibilité au glucose, le métabolisme des lipides et la pression artérielle chez des rongeurs insulino-résistants (Zhang et al., 2009). En outre, certains médicaments contre le diabète comme la metformine ont pour cible cette protéine AMPK ce qui augmente son intérêt pour les études cliniques et la mise en place de thérapies contre le syndrome métabolique ou le diabète de type II (Natali et Ferrannini, 2006).

c) La rapamycine

La rapamycine, molécule produite par *Streptomyces hygroscopus*, une bactérie vivant dans le sol, a été initialement purifiée dans les années 70 comme un agent antifongique. Des études ont démontré par la suite qu'elle agissait comme un inhibiteur des cellules T et fut utilisée dans les traitements post-opératoires des greffes rénales. La rapamycine agit en inhibant une serine/thréonine kinase (mTOR, mammalian Target Of Rapamycin) impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la survie cellulaire. Un grand nombre d'études ont montré qu'une perturbation dans la voie de signalisation de mTOR induit des pathologies ainsi que des cancers (Beevers et al., 2006). Par ailleurs, l'inhibition de mTOR par la rapamycine empêche dans certains cas la prolifération des cellules tumorales (Das et al., 2012). De même chez la drosophile, la rapamycine augmente la durée de vie (Moskalev et Shaposhnikov, 2010). Cette molécule est également efficace dans l'allongement de la durée de vie quand elle est administrée chez des souris dès l'âge de 9 mois (Miller et al., 2011), et également chez des souris âgées (Harrison et al., 2009).

d) La spermidine

La spermidine, qui fait partie des polyamines, fait l'objet récemment d'un grand nombre d'études en vue d'élucider son rôle physiologique, notamment lors du processus du vieillissement. On sait déjà que la spermidine est un acteur important dans la croissance et le stress cellulaire et la résistance face aux maladies (voir pour revue, Wallace et Fraser., 2004). De même de grandes quantités de polyamines ont été observées au sein de cellules cancéreuses, laissant penser que ces molécules jouent un rôle dans le développement des cancers. Plus récemment, la spermidine a révélé jouer un rôle dans la longévité (Eisenberg et al., 2009). Une étude récente a révélé que l'administration alimentaire de spermidine chez plusieurs organismes augmente les durées de vie chronologique et réplicative des levures, de même elle augmente la durée de vie de 15% chez le nématode (*C. elegans*) et jusqu'à 30% chez la drosophile (voir pour revue, Minois et al., 2011). Ces résultats suggèrent fortement que la spermidine pourrait représenter une nouvelle molécule anti-âge dans le cadre de la lutte contre le vieillissement, même si elle n'est pas encore définie comme un mimétique de la restriction calorique.

2) Le resvératrol, composé phénolique naturel

Au cours des 15 dernières années, l'intérêt pour les bienfaits des composés polyphénoliques s'est accru : plusieurs études épidémiologiques ont suggéré qu'il existait une relation entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et la prévention de certaines maladies (Gollücke et al., 2012). En effet, la consommation de fruits et de légumes permet de prévenir certains cancers ou bien encore de ralentir l'apparition de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Choi et al., 2012). La consommation régulière de vin pourrait également limiter les maladies cardio-vasculaires (Vasanthi et al., 2012). Un des composés phénoliques du vin, le resvératrol, est un des candidats les plus prometteurs quant à sa capacité mimétique des effets bénéfiques de la restriction calorique (Figure 17). Le nom du resvératrol viendrait de *Veratrum album L. var grandiflorum*, le vératre blanc, d'où il a été extrait pour la première fois en 1939 par un japonais, Takaoka.

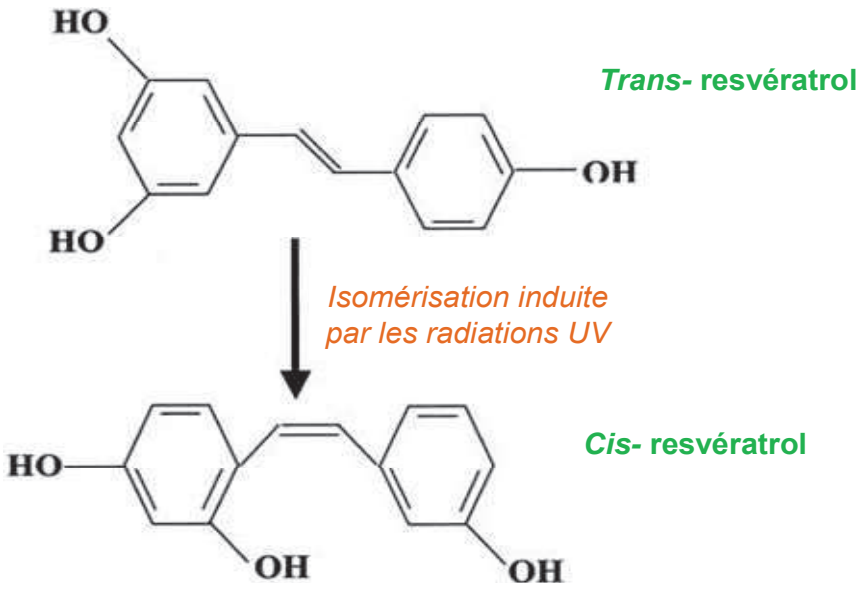


Figure 17. *Structures chimiques du resvératrol. Le resvératrol se présente sous deux formes isomères, trans- et cis-, avec un passage de la forme trans- à la forme cis- par irradiation UV. Le trans-resvératrol est une molécule photosensible qu'une simple exposition à la lumière suffit à transformer de manière irréversible dans son isomère cis. C'est un composé instable supportant aussi assez mal les températures élevées et les milieux oxydants. L'isomère trans est la forme bioactive. Il a été montré que l'activité anti-oxydante du cis-resvératrol, forme isomérisée, est 7 fois inférieure à celle du trans-resvératrol (Fauconneau et al., 1997).*

Dans les années 90, le resvératrol est devenu « célèbre » puisque certains scientifiques ont déterminé que cette molécule était la clé du « French paradox ». En 1992, Renaud S. et De Lorgeril M. découvraient grâce à une étude épidémiologique que les Français avaient un risque inférieur de maladies coronarienne et cardio-vasculaire, malgré un régime riche en graisses saturées (produits laitiers et graisses animales). La faible occurrence de ces maladies a été corrélée, dans une certaine mesure, avec leur consommation de vin rouge (Renaud et De Lorgeril, 1992). Quelques années après, Das et al. (1999) démontraient que le resvératrol était le composé naturel responsable de cet effet. Cette molécule de la famille des stilbènes présente plusieurs propriétés bénéfiques telles qu'une action anti-inflammatoire et anti-cancérigène. Elle présente également de nombreux effets bénéfiques qui contrecarrent les effets néfastes d'un régime enrichi en lipides chez des rats en diminuant la masse corporelle, la pression artérielle et les pathologies cardiovasculaires (Baur et Sinclair, 2006).

3) Effets physiologiques du resvératrol chez différentes espèces

De nombreuses études ont montré que le resvératrol agit de manière bénéfique sur certains aspects la santé, corroborant avec les effets bienfaisants de la restriction calorique (Baur, 2010). Molécule synthétisée dans de nombreuses plantes telles que les arachides, les bleuets, les pins et les raisins, le resvératrol protège les végétaux contre les infections fongiques et l'irradiation des rayons ultra-violets (Bavaresco, 2003). Depuis lors, de nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées au resvératrol, y compris des vertus anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes et antimicrobiennes (Pervaiz et Holme, 2009). Les effets bénéfiques de ce polyphénol ont été principalement attribués à ses propriétés anti-oxydantes, mais plus récemment, par son action sur diverses molécules de signalisation (Pervaiz et Holme, 2009). Le resvératrol est considéré comme un agent pléiotropique (Figure 18), car il peut agir sur une multitude de cibles, y compris la surface des cellules et certains récepteurs intracellulaires, les molécules de transduction du signal, du métabolisme et des protéines de réparation d'ADN ainsi que des facteurs de transcription (Pervaiz et Holme, 2009). Certaines études ont montré que ces actions étaient « modulables » en fonction de la dose, du type de cellules étudié et des variations génétiques au sein d'une population (Mukherjee et al., 2010). A de faibles concentrations, le resvératrol protège contre le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Mukherjee et al., 2010). Cependant, à forte dose, le resvératrol a des effets chimio-thérapeutiques, induisant alors un arrêt du cycle cellulaire (mitose) et entraînant l'apoptose des cellules cancéreuses (Mukherjee et al., 2010).



Figure 18. *L'effet pléiotropique du resvératrol. Résumé des applications cliniques potentielles de ce polyphénol et mécanismes d'actions associés. AMPK : adenosine monophosphate activated proteine kinase ; HDL : high density lipoprotein ; Ils : interleukines ; LDL : low density lipoproteins ; TG : triglycérides ; TNFα : tumour necrosis factor alpha ;(adapté de Chachay et al., 2012).*

Le resvératrol module la sécrétion d'insuline, préserve les cellules ß du pancréas, favorise la consommation du glucose par les cellules musculaires, diminue le stress oxydatif et améliore la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques (Szkudelski et Szkudelska, 2011). Fait important, les effets du resvératrol sur la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline semblent induits par l'activation de SIRT1 (Lee et al, 2009; Sun et al, 2007). L'action protectrice du resvératrol sur les maladies cardiovasculaires était bien connue avant son action sur SIRT1. Le resvératrol empêche les dommages cellulaires causés par les espèces réactives à l'oxygène, joue également un rôle important dans les processus inflammatoires et

inhibe l'agrégation des plaques thrombotiques artérielles (Ramprasath et Jones, 2010). Dans la littérature, de nombreuses études suggèrent l'implication de SIRT1 dans les maladies cardiovasculaires. Cependant, la plupart de ces études reposent sur la modulation pharmacologique de SIRT1 à travers diverses molécules telles que le resvératrol. Néanmoins, deux groupes ont démontré que le resvératrol est directement impliqué dans la cardio-protection, via SIRT1 (Csiszar et al, 2008; Csiszar et al, 2009).

De même, l'effet du resvératrol dans les maladies neurodégénératives a été attribué à sa capacité à protéger les cellules neuronales contre diverses agressions, notamment celles causées par le stress oxydatif (Alvira et al, 2007; Kim et al, 2006; Sharma et Gupta, 2002). Chez des sujets sains, le resvératrol protège les neurones de l'apoptose induite par le stress oxydatif et également de l'inflammation (Candelario-Jalil et al, 2007; Sharma et Gupta, 2002). Chez des modèles de pathologies induites, de type Alzheimer, le resvératrol inhibe l'agrégation peptidique d'amyloïdes ß amenant ainsi à une réduction de la formation des plaques séniles (Albani et al., 2010).

L'étude de la RC chez des modèles expérimentaux a permis et permet encore l'identification de certains mécanismes impliqués, à l'échelle de la cellule et de l'organisme, dans le retard d'apparition du déclin des fonctions de l'organisme et de l'augmentation de la durée de vie. Cette base précieuse est nécessaire au développement de mimétiques des effets bénéfiques constatés de la RC. De nombreuses études portent actuellement sur certaines molécules qui reproduisent les effets positifs de la RC, déjà constatés chez de nombreuses espèces et qui semblent très bien conservés, sans imposer un régime drastique. L'ensemble de ces travaux contribue largement à une meilleure compréhension de la biologie du vieillissement d'une part et ouvre des voies sérieuses et prometteuses quant au développement de stratégies thérapeutiques applicables à l'Homme. Le resvératrol semble avoir rempli les conditions que les chercheurs attendent d'un mimétique de la RC. Depuis sa découverte il y a plus de 70 ans, de par ses propriétés anticancéreuses, antioxydantes et anti-inflammatoires, cette molécule pléiotropique possède des effets sur de nombreux tissus. Alors que les études portant sur l'Homme sont encore assez limitées mais se multiplient progressivement, aucune étude n'a encore été réalisée chez un modèle de primate non-humain. Une supplémentation en resvératrol, même commencée à l'âge adulte, permet d'accroître dans certains cas la durée de vie chez plusieurs espèces. Ces résultats récents laissent présager que les voies de signalisation induites en réponse à une restriction calorique chronique ou à une supplémentation

alimentaire en resvératrol seraient potentiellement similaires. Si ces résultats venaient à se confirmer chez un modèle de primate non humain, le resvératrol deviendrait potentiellement une molécule de choix dans la lutte contre le vieillissement chez l'Homme.

Figure 19 - Bilan

Etant donné les nombreuses données relatives à la restriction calorique et au resvératrol, voici un bilan mettant en évidence les avantages, les inconvénients et ce que l'on ne connaît pas encore pour chaque protocole anti-âge.

	Restriction calorique	Resvératrol
Points forts	Plusieurs modèles animaux testés	Mimétique de la restriction calorique
	Augmente la durée de vie chez plusieurs espèces	Augmente la durée de vie chez unicellulaires et invertébrés
	Nombreux effets bénéfiques	Nombreux effets bénéfiques
	Régulation métabolique	Régulation métabolique
	Retard d'apparition de pathologies liées à l'âge	Chemoprévention et limitation de la cancérogénèse
Points faibles	Contraignant à long terme	N'augmente pas la durée de vie chez mammifères
	Limites d'utilisation chez l'homme	Métabolisme faible chez mammifères
	Diminution de la température corporelle; perturbation de la thermorégulation	Biodisponibilité faible et dépendant du rythme circadien
	Altération des comportements alimentaires et humeurs	Doses et durée de traitement très variables d'une étude à l'autre
	Défavorable à la reproduction et comportement sexuel	Activation des mêmes voies de régulation que la restriction calorique très controversée
	Les effets bénéfiques dépendent de l'intensité de la restriction	Recul sur effet pleiotropique peu documenté
Inconnu	Augmentation de la longévité chez des espèces à durée de vie longue ?	Tolérance et toxicité à long-terme (>90j de traitement)?
	Effets à long terme chez le macaque rhésus ou chez d'autres primates non-humains ?	Etudes chez modèles animaux phylogénétiquement proches de l'homme ?

Alors que le vieillissement atteint des allures de « pandémie », peu de preuves et d'évidences sont reportées chez l'Homme concernant l'un ou l'autre des protocoles anti-âge. La partie suivante de ce manuscrit à donc pour objectif d'énoncer les avantages de la mise en place d'une étude à long terme chez une espèce phylogénétiquement proche de l'Homme, un primate non-humain, faisant intervenir une restriction calorique modérée et chronique et en parallèle, un apport alimentaire en resvératrol.

Modèle d'étude

I) Présentation du modèle d'étude : le microcèbe murin

1) Phylogénie et classification

Au début de l'ère tertiaire, il y a environs 65 millions d'années, les primates se sont séparés en deux groupes : les Simiens qui représentent la branche primitive de l'Homme et les Prosimiens dont les représentants modernes sont les lémuriens. Les ancêtres communs aux lémuriens ont colonisés, par un moyen inconnu, l'île de Madagascar entre 47 et 54 millions d'années, donnant lieu à l'étonnante diversité que l'on peut rencontrer au sein des primates malgaches (Tattersall, 1982). Cinq grandes familles de lémuriens se distinguent : la famille des Cheirogaleidés (comprenant les microcèbes), les Mégaladapidés, les Lémuridés, les Indriidés et les Daubentonidés. Les études cytogénétiques ont démontré que la divergence du caryotype de la famille Cheirogaleidé par rapport au caryotype ancestral, est minime (Yoder et al., 2003). Cependant, aucune phylogénie n'accorde une position basale aux microcèbes au sein des Cheirogaleidés (Génin et Masters., 2011) (Figure 1).

La sous-famille des Cheirogaleidés comprend quatre genres: *Allocebus*, *Cheirogaleus*, *Mirza* et *Microcebus*. En particulier, le microcèbe murin (*Microcebus murinus*) qui appartient au genre *Microcebus*. La taxonomie des microcèbes est restée longtemps inchangée jusqu'à la découverte de deux nouvelles espèces, vivant en sympatrie avec *Microcebus murinus*: il s'agit de *Microcebus myoxinus* également appelé le lémurien pygmée (Peters en 1852) et le plus petit primate connu dans le monde : *Microcebus ravelobensis* aussi appelé le microcèbe doré (Zimmermann et al., 1998). Durant cette dernière décennie, la découverte de nouvelles espèces du genre *Microcebus* a apporté de nouveaux indices et de nouvelles données génétiques permettant de préciser leur taxonomie.

Le terme « microcèbe » sera employé de manière simplifiée dans ce manuscrit pour désigner *Microcebus murinus*.

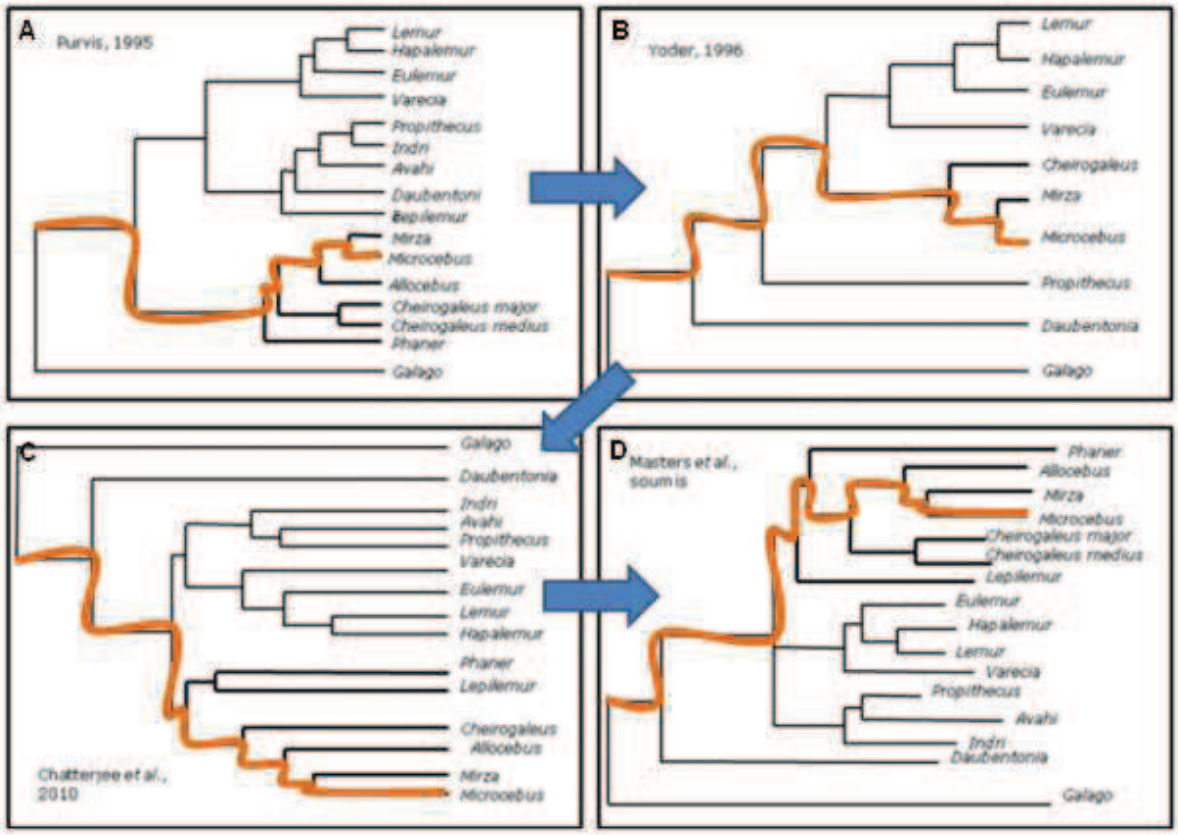


Figure 1. *Evolution de la phylogénie de strepsirhiniens entre 1995 et 2011. La position de la famille des Cheirogaleidés et du genre Microcebus (traits orange) est basée sur des données moléculaires et morphologiques et établie par A : Purvis, 1995 ; par B : Yoder, 1996 : données composites incluant des caractères anatomiques et des séquences complètes de cytochrome b (mitochondrial) ; par C : Chatterjee et al., 2010 : ADN mitochondrial (7 gènes) et nucléaire (3 gènes) et par D : Masters et al., in press : données morphologiques et ADN mitochondrial. (Adapté de Genin et Masters., 2011).*

2) Caractéristiques morphologiques

Le microcèbe fait partie des plus petits primates que l'on connait à ce jour dans le monde. Il présente une longueur, de la tête à la queue, de 25 cm en moyenne, avec une longueur de queue pratiquement équivalente à celle du corps. Le microcèbe présente un poids moyen de 70 g en été et de 100 g en hiver, et la femelle est généralement plus corpulente que le mâle, indépendamment de la saison.

Il arbore une fourrure brune et grise qui lui permet de se camoufler dans les arbres et les feuilles des forêts qu'il habite. *M.murinus* est une espèce arboricole, très à l'aise dans ses

déplacements d'arbres en arbres, pouvant effectuer des sauts de plus de 2 m grâce à ses puissantes pattes antérieures et postérieures, et grâce à ses mains et ses pieds munis d'un pouce opposable. De plus l'extrémité de ses doigts est recouverte de petites structures épidermiques en plis et creux appelés dermatoglyphes, lui permettant ainsi une adhésion et une stabilité lors de ses déplacements sur différents types de surface.

Ses yeux sont très volumineux, représentant 1,5% de sa masse corporelle, localisés en position frontale, ce qui lui permet d'avoir un champ visuel élargi (230°) et plus important que chez d'autre primates, comme l'Homme (120°). *M. murinus* révèle des adaptations anatomiques spécifiques à une vision nocturne, comme un tapis choroïdien (le *tapetum lucidum*), structure qui tapisse le fond de l'œil et qui augmente la quantité de lumière captée par réflexion pendant la nuit.

Une autre adaptation à la vie nocturne est ses pavillons auriculaires fortement développés. Les oreilles sont membraneuses, bien détachées du reste de la tête et leurs faces internes sont en relief (replis) pour optimiser la perception des sons pendant la nuit, favorisée également par une grande mobilité (Schilling, 2000).



Figure 2. *Le microcèbe (Microcebus murinus) et ses caractéristiques morphologiques: fourrure grise et brune, longue queue, pouces opposables au niveau des mains et des pieds, yeux et oreilles développés. (Source ; Microcebus murinus (J. F. Miller, 1777) - Lesser Mouse Lemur, Milan Korinek).*

3) Distribution et habitat naturel

« Ile-continent », « île rouge » comme elle est couramment surnommée, l'île de Madagascar est aussi la 4ème plus grande île du monde s'étendant sur environ 587.000 km^2. Elle présente une diversité topographique ainsi que des contrastes climatiques régionaux : la côte Est et la côte Ouest, représentant deux zones biogéographiques distinctes, sont séparées par un plateau central. Le sud de l'île se caractérise par un environnement désertique entrecoupé d'une forêt épineuse et sèche, tandis que la côte Ouest arbore des forêts de feuillus tropicaux et la côte orientale est couverte de forêts tropicales. Le microcèbe peuple les forêts sèches à feuilles caduques de l'ouest et les forêts du désert épineux au sud de Madagascar (Mittermeier et al., 1994) (Figure 3).

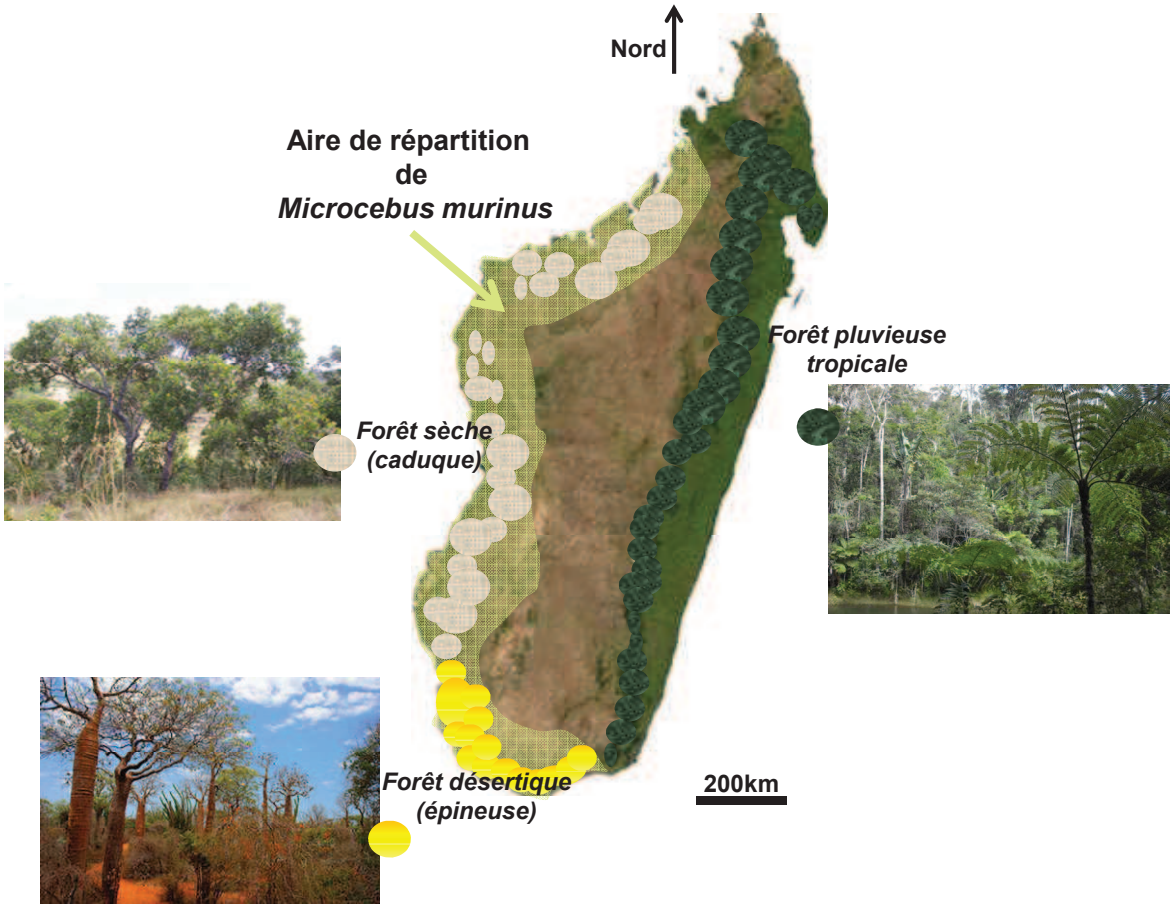


Figure 3. *Schématisation de l'aire de répartition du microcèbe (zone verte claire) et des différents habitats (forêts désertiques épineuses du Sud de l'île et forêts sèches caduques de l'Ouest de l'île) (adaptée de Wright, 1999).*

Madagascar est marquée par une forte saisonnalité : les fluctuations climatiques varient le long de la vaste étendue latitudinale. La moyenne des températures ambiantes locales (été/hiver) varient entre 18/25°C dans le sud de l'île, et entre 24/27°C et 24/28°C sur la côte Ouest et la côte Est, respectivement. Les nivaux de précipitations différent également de manière importante entre les trois habitats. Ainsi les précipitations sont minimales dans le sud de l'île avec 500 mm/an et maximales sur la côte Est de l'île pouvant atteindre 2000-4000 mm/an.

D'avril à novembre, la disponibilité en nourriture et en eau est fortement réduite par rapport au reste de l'année (Hladik, 1980). Les températures varient quotidiennement et peuvent descendre jusqu'à 10°C dans la nuit et atteindre 25°C dans l'après-midi pendant la saison sèche, dans la partie Ouest de Madagascar. Outre cette saisonnalité marquée, Madagascar connaît des épisodes fréquents de catastrophes climatiques imprévisibles telles que les cyclones, les tempêtes et la sécheresse, dus en particulier au phénomène « El Niño Southern Oscillation » (ENSO) qui peut durer jusqu'à plusieurs mois en saison chaude et humide (été malgache), engendrant une pénurie alimentaire imprévisible pendant cette saison d'ordinaire fertile.

Dans la forêt secondaire et la végétation basse, on peut rencontrer le microcèbe à partir du sol jusqu'à une hauteur d'environ 10 m. A l'intérieur des fôrets denses primaires, il peut également atteindre la canopée à des hauteurs variant entre 15 et 30 m. Il se réfugie généralement dans les branches en hauteur, dans les lianes et les feuillages denses. Il peut aussi bien se déplacer sur des courtes distances au sol que sur de longues distances lorsqu'il se déplace en milieu arboricole (Martin, 1972).

Il niche habituellement dans des nids de feuilles sphériques ou dans des arbres creux ou présentant des cavités. Ces endroits propices lui permettent à la fois d'assurer sa thermorégulation ainsi qu'une protection vis-à-vis des prédateurs. Les forêts secondaires offrent un large éventail de possibilités de nidification, mais comme pour les autres lémuriens, ses habitats ont subi d'importantes modifications dues à l'Homme et aux facteurs d'anthropisation telles que la déforestation.

4) Alimentation et reproduction

Le microcèbe se nourrit la nuit, de manière solitaire. Ses ressources alimentaires primaires sont les fruits, les fleurs, les gommes (Radespiel, 2006), les insectes, les arachnides, les sécrétions d'insectes et sporadiquement de très petits vertébrés (Martin, 1973 ; Corbin et

Schmid, 1992). Les sécrétions d'insectes (Homoptères) représentent jusqu'à 40% de son temps de fourragement, surtout pendant la saison sèche où elles représentent la principale ressource d'alimentation du microcèbe (Radespiel, 2006). Une étude dans le Sud-Ouest de Madagascar et pendant la saison sèche, a montré que la présence d'Homoptères, et donc de secrétions, était corrélée à l'augmentation de l'étendue des sites de fourragement chez les femelles microcèbes.

Les femelles microcèbes ont un accès prioritaire à la nourriture face aux mâles. Cette dominance est la base de l'organisation sociale de cette espèce (Radespiel et Zimmermann, 2001). Les groupes s'organisent autour des femelles et comportent des mâles dominants, ce qui constitue un « noyau ». Les mâles dominants peuvent avoir un domaine vital qui superpose celui des femelles mais les mâles dominés sont contraints de rester en périphérie du groupe. Des études récentes ont montré que les domaines vitaux de dispersion de mâles et de femelles munis de colliers émetteurs, peuvent très bien se chevaucher (Fietz, 1999, Radespiel et al., 1998). Et ce particulièrement pendant la saison de reproduction (saison chaude et humide), durant laquelle le domaine des mâles s'étend significativement, probablement du à la recherche active de femelles en œstrus. Ainsi la sex-ratio est biaisée en faveur des femelles au sein des noyaux tandis qu'elle est biaisée en faveur des mâles à la périphérie des groupes (Martin, 1972).

Pendant la période de reproduction, le partage des nids entre les mâles et les femelles se produit plus fréquemment que durant le reste de l'année. Lors de l'accouplement, un seul mâle peut être présent parmi un groupe de femelles.

Dans la période qui suit l'œstrus, les femelles se regroupent dans le nid pouvant alors se composer de 4 à 5 individus, ainsi, les femelles d'un même nid sont la plupart du temps liées génétiquement. L'étude de Radespiel et al. (2001) a révélé que 5 groupes de femelles sur 6 étudiés, se composaient d'une (ou plus) dyade génétique, alors que les femelles qui nichent seules n'ont pas de similarités génétiques avec le reste des individus du groupe. Les mâles quant à eux, nichent seuls, souvent dans la végétation.

La stratégie de partage des nids joue un rôle important dans la limitation des coûts énergétiques au cours des périodes de repos diurnes (Perret, 1998). Par conséquent, la compétition intersexuelle pour les ressources et la dominance des femelles chez cette espèce peuvent probablement expliquer les différences spécifiques observées et liées au sexe dans la qualité des sites de nidification utilisés et dans les différences d'investissement parental au soin des jeunes.

5) Rythmes saisonniers

En milieu naturel, les changements saisonniers physiologiques et comportementaux du microcèbe dépendent de la variation locale photopériodique, qui varie entre 11 et 13 heures par jour, en hiver et en été, respectivement. Des expériences ont démontré que ces variations saisonnières restent inchangées en captivité chez des microcèbes exposés aux photopériodes naturelles de nos latitudes ou exposés à des photopériodes recréées par une lumière artificielle (Aujard et al., 1998 ; Perret et al., 1998 ; Genin et al., 2000). L'intensité et la durée d'exposition à la lumière sont des informations transmises via la rétine, aux noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus antérieur. Ces informations permettent aux neurones des noyaux supra-chiasmatiques de se resynchroniser quotidiennement avec la lumière du jour. Ces noyaux influent sur la glande pinéale (via le noyau para-ventriculaire), et permettent ainsi d'ajuster les cycles de plusieurs fonctions physiologiques et comportementales.

L'exposition à des cycles lumineux artificiels consistant en des périodes alternées de jours courts (JC ; <12h de lumière par jour) et de jours longs (JL ; >12h de lumière par jour) entraîne une variation cyclique de la masse corporelle et de la fonction de reproduction à la fois chez le microcèbe mâle et chez le microcèbe femelle en captivité. L'exposition aux JC conduit à une inhibition complète de la fonction de reproduction chez les deux sexes, à un engraissement (augmentation du tissu adipeux dans l'abdomen et la queue) et à la réduction du métabolisme basal. A l'inverse, l'exposition aux JL stimule l'activité de reproduction et déclenche des modifications comportementales mais également physiologiques (état métabolique et hormonal) (Perret et al., 1998 ; Perret et Aujard, 2001) (Figure 4).

Chez le microcèbe mâle, la rythmicité saisonnière est reproduite grâce à l'alternance d'exposition aux JC et aux JL. La testostérone plasmatique présente un cycle circannuel avec des niveaux élevés en JL, atteignant en moyenne, les 60ng/mL en moyenne, tandis que les concentrations sont très faibles lors de l'exposition aux JC (9ng/mL en moyenne) (Perret, 1992).

Le contrôle du système reproducteur mâle est basé sur l'existence d'une période réfractaire durant laquelle les fonctions sexuelles régressent spontanément alors qu'elles augmentent lors de la période d'induction lorsque les jours se rallongent (Perret et Aujard, 2001).

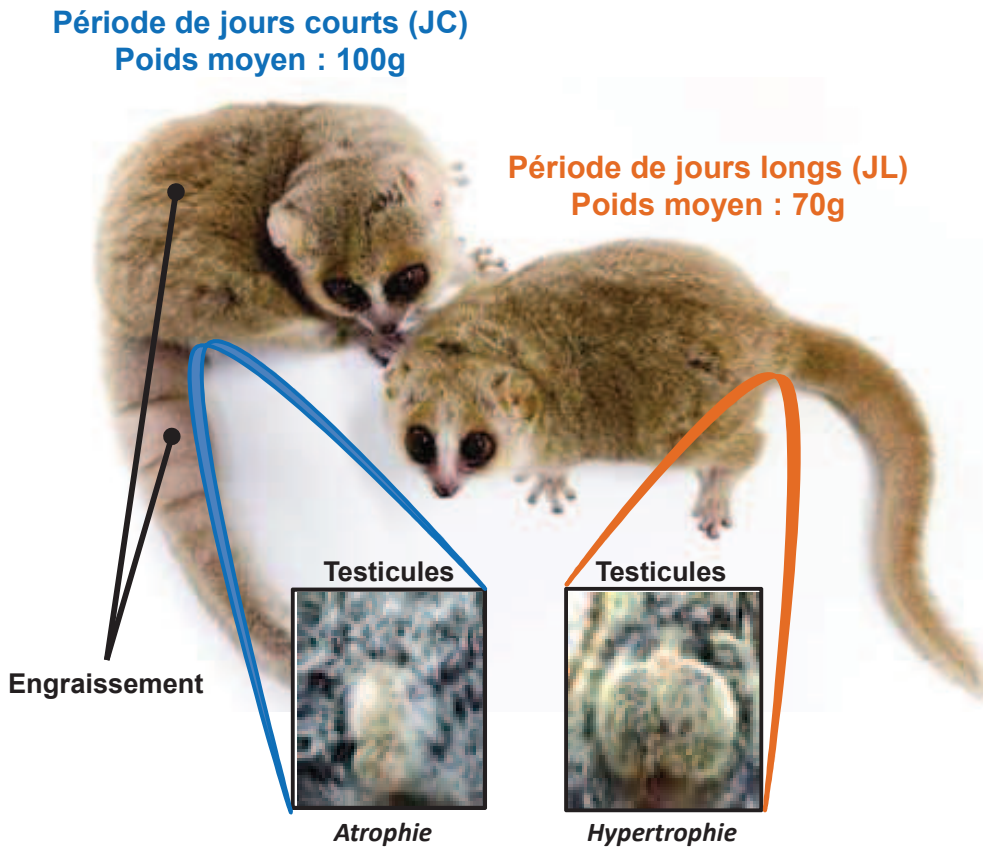


Figure 4. *Caractères morphologiques de la saisonnalité chez le microcèbe. Photographie de deux microcèbes de la colonie de Brunoy, exposés à deux photopériodes différentes. En JC : augmentation du poids résultant d'une augmentation de la masse grasse particulièrement au niveau de l'abdomen et de la queue, et atrophie des testicules. En JL : diminution de la masse corporelle ainsi qu'une hypertrophie des organes génitaux.*

Chez les microcèbes femelles, les jours courts entrainent une régression complète des organes génitaux (anoestrus saisonnier ; Perret et al., 2000), tandis que les jours longs induisent le cycle oestrien composé d'une succession de modifications morphologiques de la zone vaginale avec une phase de prè-oestrus et d'oestrus (ouverture vaginale).

6) Rythme circadien : activité locomotrice et température corporelle

Comme certains autres membres de la famille des Cheirogaleidés, le microcèbe est capable d'entrer en hypothermie journalière, particulirément pendant la saison sèche, en réponse à des températures froides et à des ressources alimentaires et hydriques quasi-nulles (Martin, 1973 ; Ortman et al., 1997 ; Schmid, 1999). Les rythmes journaliers de la

température corporelle et de l'activité locomotrice observés dans la nature sont aussi bien reproduits en captivité. En captivité, indépendamment de la saison, le rythme journalier de la température corporelle du microcèbe se caractérise essentiellement par la présence d'une phase d'hypothermie entraînée par l'alternance jour/nuit et qui se produit au lever du jour (Génin et Perret, 2003 ; Séguy et Perret, 2005). Durant la phase d'activité nocturne, les valeurs élevées de la température corporelle sont associées aux activités comportementales (locomotion, alimentation, interactions sociales). Une diminution rapide de la température corporelle débute immédiatement à la fin de la nuit avec des valeurs minimales 2 à 3 heures après le début de la phase diurne. Cette torpeur diurne prend fin environ 6 heures après le début du jour, avec une remontée progressive de la température corporelle à des valeurs normothermiques stables jusqu'à la nuit suivante (Figure 5).

La sortie des phases d'hypothermie est régulée de façon endogène et met en oeuvre des mécanismes de thermogénèse de frisson (les frissons thermiques sont des contractions rapides des muscles striés squelettiques) et de non-frisson (tissu adipeux brun), cette dernière impliquant l'activation du tissu adipeux brun présent chez ce primate (Terrien et al., 2010).

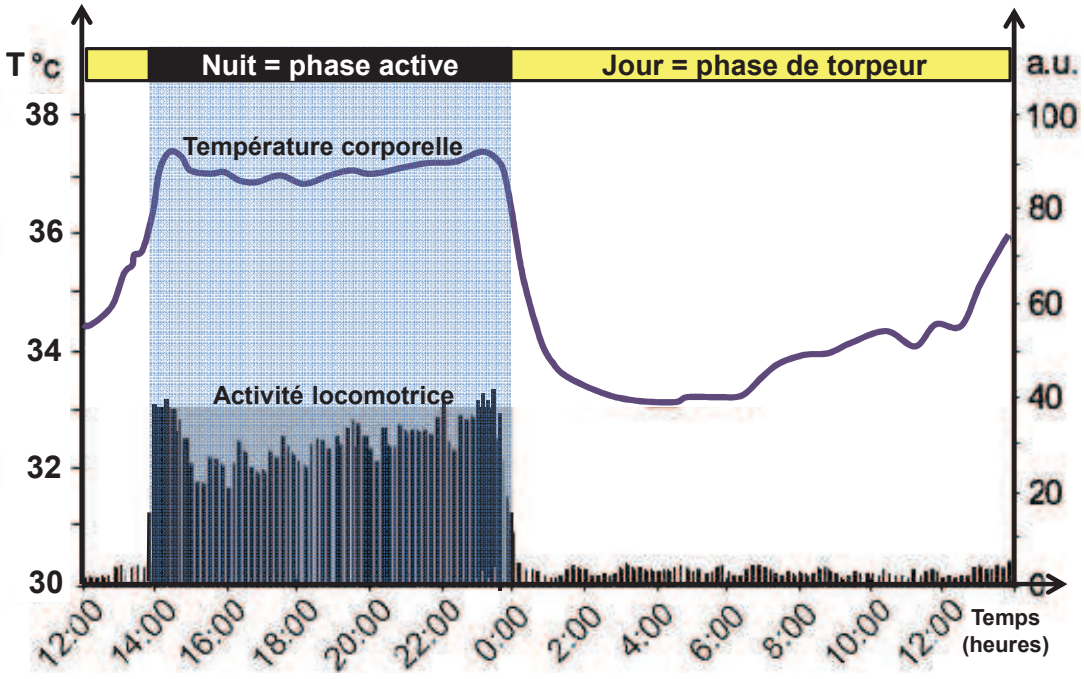


Figure 5. *Représentation du rythme circadien de la température corporelle (Tc en degrés Celsius) et de l'activité locomotrice spontanée (a.u = unité arbitraire) d'un microcèbe exposé à une photopériode de JC. (Adapté de Canale et al., 2010).*

II) Le microcèbe : un modèle d'étude du vieillissement

Les primates non humains sont un bon compromis entre les modèles d'études unicellulaires, invertébrés ou encore petits mammifères et l'Homme. En effet ils constituent un modèle indispensable dans le cadre des recherches bio-gérontologiques modernes et promettent des résultats transposables. Le microcèbe prend place à part entière au sein de ces modèles d'études bénéficiant d'avantages par rapport aux plus grands primates non-humains comme les macaques rhésus. Cette partie du manuscrit (inspirée de **l'Article 1**, **Annexe A**, Languille et al., 2012) vise à dresser un bilan des atouts de l'utilisation du microcèbe dans le cadre d'études liées au vieillissement et à apporter une vue d'ensemble sur les résultats jusqu'alors obtenus chez cette espèce, en condition de captivité.

1) Caractéristiques morphologiques du vieillissement

Des modifications morphologiques sont observables lorsque le microcèbe est âgé d'environ 5/6 ans. Il est facile de différencier visuellement sur des critères d'apparence un individu adulte d'un individu âgé (> 6ans). Ces « indices » sont le blanchiment de la fourrure au niveau du ventre, du dos et de la tête. Le museau a tendance à raccourcir et la partie membraneuse des oreilles s'épaissit et se racornit (Figure 6).

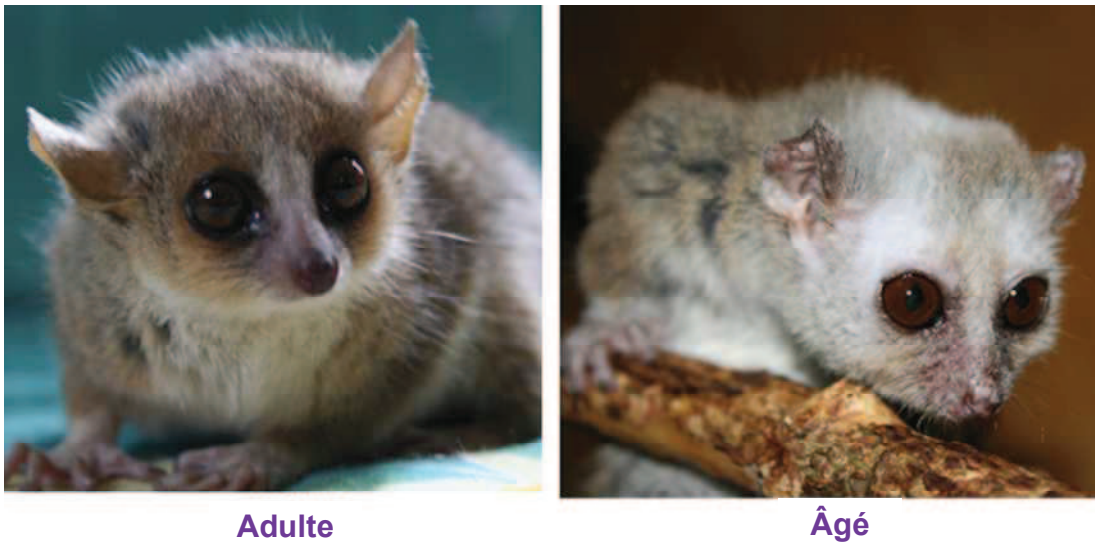


Figure 6. *Photographies représentatives d'un microcèbe adulte (5 ans) et d'un microcèbe âgé (>6 ans). (Adaptées de Languille et al., 2012).*

2) Longévité et survie

La longévité de 643 microcèbes provenant de l'élevage de Brunoy, dont 361 femelles et 282 mâles, a été analysée (uniquement pour des animaux nés et morts en captivité) (Figure 7). La durée médiane de survie, moment auquel la moitié de la population est morte, est généralement utilisée pour différencier les individus adultes des individus âgés d'une population. Dans cette colonie, la durée médiane de survie des femelles est de 4,9 ans tandis qu'elle est de 5,7 ans pour les mâles. Ainsi, nous considérons les microcèbes âgés de 5 ans en tant qu'individus adultes et âgés de plus de 6 ans en tant qu'individus âgés.

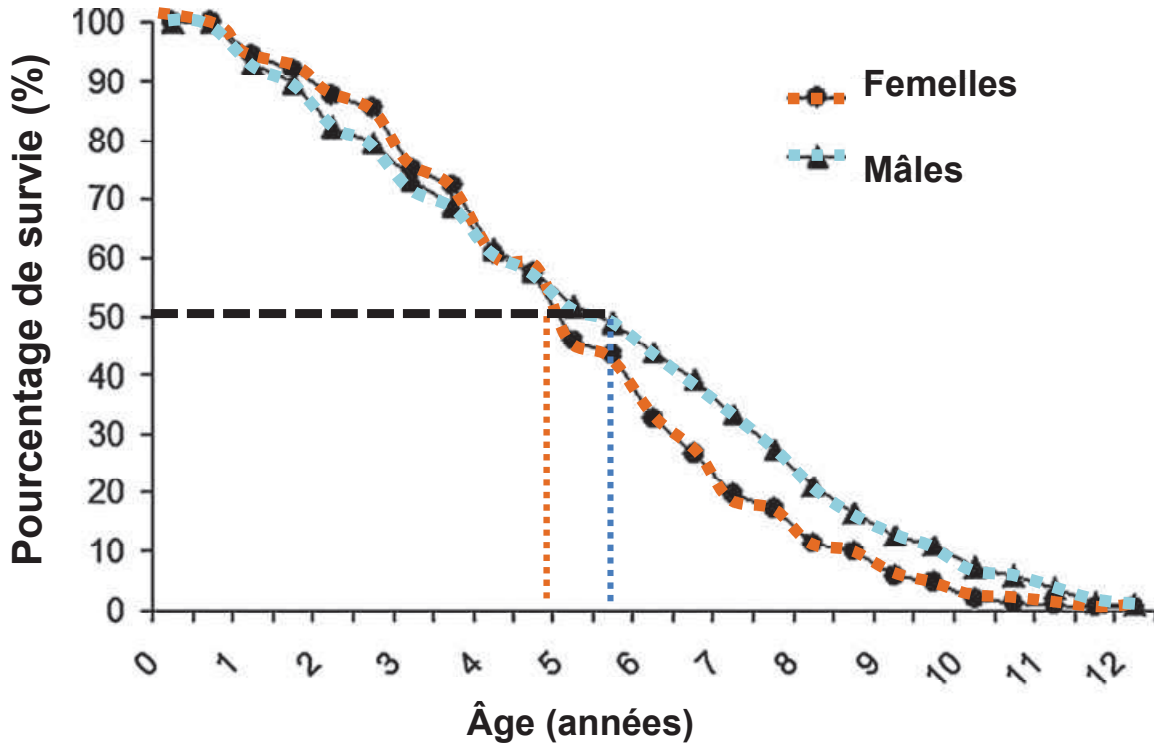


Figure 7. *Courbe de survie établie pour 643 microcèbes de la colonie de Brunoy. Les femelles, n=361, sont représentées avec la couleur orange et les mâles, n=282, sont représentés par la couleur bleue. Les durées médianes pour chaque sexe sont également représentées (lignes en pointillés). (Adaptée de Languille et al., 2012).*

Dans les conditions naturelles, les animaux atteignent rarement la « phase » de vieillissement et donc leur durée de vie maximale, puisqu'ils sont exposés à plusieurs causes de mortalité qui n'existent pas en captivité (prédation, parasitisme, pénurie de ressources).

Au sein de la colonie de Brunoy, la longévité maximale enregistrée est de 12 ans et la durée de vie moyenne dépend à la fois du sexe et de la photopériode. Ainsi 72% des femelles meurent durant les périodes de JL contre 59% chez les mâles. La période de JL correspond à la période de reproduction ce qui pourrait expliquer cette différence dûe au sexe et à l'impact de la saisonnalité sur le taux de mortalité. Concernant les causes de la mort, les microcèbes adultes meurent généralement de complications suite à des blessures ; chez les individus âgés, quelques cas de cancers ont été recensés ainsi qu'une détérioration de la fonction rénale menant majoritaire à des crises d'urémie ou des néphrites.

3) Balance énergétique et vieillissement

Chez les mammifères, le métabolisme basal diminue avec l'âge, principalement dû à la diminution de la masse « maigre » de l'organisme autrement dit de la masse musculaire. Ceci est lié en partie à une diminution et une fragmentation de l'activité locomotrice avec l'âge chez les individus vieillissants. Le métabolisme est également diminué par une baisse des électrolytes sodium et potassium et par une diminution de l'activité de l'enzyme Na-K-ATPase métabolisant l'ATP (énergie cellulaire consommatrice d'oxygène). Chez le microcèbe, le métabolisme basal et la masse corporelle fluctuent en fonction des saisons avec de grandes amplitudes. Les animaux présentent une phase d'engraissement et une réduction métabolique en période hivernale, et ces évolutions s'inversent en période estivale. Avec l'âge, les variations saisonnières de ces deux paramètres sont altérées puisque l'amplitude de ces variations décroît (Figure 8).

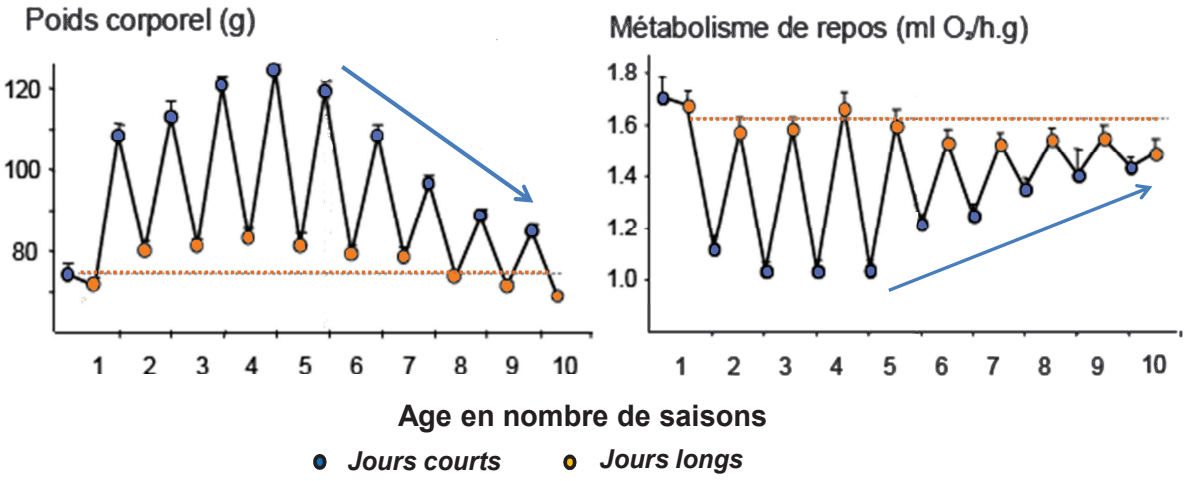


Figure 8. *Variations saisonnières de la masse corporelle et du métabolisme de repos en fonction de l'âge du microcèbe (d'après Perret et Aujard, 2006).*

Ces résultats suggèrent une altération des réponses à la photopériode chez le microcèbe âgé (Perret, 1997 ; Perret et Aujard, 2006). Pendant les périodes de jours courts, le vieillissement chez le microcèbe est également accompagné d'un accroissement de la dépense énergétique parallèlement à un bilan énergétique qui diminue.

4) Fonctions hormonales et vieillissement

Le maintien de l'homéostasie d'un organisme fait appel à la fois au système nerveux central et au système endocrinien. Il est largement admis que le vieillissement s'accompagne de perturbations de la régulation et de la sécrétion hormonale, notamment chez l'Homme. Cependant l'interprétation d'une telle modification est difficile à réaliser dans son ensemble au vu de la complexité du système endocrinien et de ses nombreuses cibles de même qu'au vu de la grande variabilité inter- et intra-individuelle observée au cours du vieillissement (Epelbaum et al., 2001 ; Barzilai et al., 2010).

a) Les hormones sexuelles

Le microcèbe présente un entraînement photopériodique des sécrétions d'hormones sexuelles chez les mâles et les femelles. Très bas pendant la phase hivernale, les taux de testostérone augmentent très fortement en début de saison de reproduction. Des altérations dans l'amplitude et dans la fréquence du rythme saisonnier des hormones sexuelles ont pu être mises en évidence au cours du vieillissement. Chez les mâles âgés, les taux de testostérone sont plus bas et présentent un décalage du pic saisonnier reflétant une désynchronisation de leurs rythmes saisonniers. Néanmoins les variations saisonnières persistent avec l'âge même si l'amplitude entre deux saisons a tendance à s'amoindrir. Parallèlement à ce déclin d'hormones sexuelles, la motivation sexuelle chez les mâles et les femelles est fortement réduite au cours de l'âge, même si aucun lien n'a été observé avec la fécondité puisque des femelles âgées de plus de 6 ans peuvent encore se reproduire.

b) Les hormones de croissance

La baisse de l'activité des hormones de croissance (comme par exemple la somatotropine et l'IGF-1, Insulin like Growth Factor-1) au cours du vieillissement joue un rôle majeur dans le déclin des fonctions de l'organisme et dans certaines pathologies

chroniques liées à l'âge, telles que les maladies cardiovasculaires et les perturbations cognitives (pour revue, voir Berryman et al., 2008 ; Gasperi et Castellano, 2010 ; Perrini et al., 2010). Par ailleurs, des études récentes ont montré qu'une diminution de l'activité de l'axe insuline/IGF-1 était accompagnée d'une durée de vie accrue chez le nématode et la drosophile (Kenyon, 2010). Les taux d'IGF-1 sont potentiellement de bons marqueurs du vieillissement chez le microcèbe, du moins en période de jours courts. En effet, chez le Microcèbe, alors que les concentrations plasmatiques d'IGF-1 restent élevées pendant la période de jours longs, indépendamment de l'âge des individus, on observe une baisse de ces concentrations dès l'âge de 4 ans en jours courts. De plus, une relation positive existe entre les taux d'IGF-1 et le poids des microcèbes mâles en jours courts qui semble être un bon marqueur de la durée de vie des animaux (Aujard et al., 2010).

c) Les hormones thyroïdiennes

Chez l'Homme, les niveaux d'hormones thyroïdiennes et de TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) sont réduites, augmentées ou inchangées au cours de l'âge (Kunikate et al, 1992; Magri et al, 2002). Malgré ces résultats contradictoires, la fonction thyroïdienne est en général maintenue dans le cadre du vieillissement « réussi » ou « normal », ne laissant pas apparaître d'impact néfaste du vieillissement sur cet organe et ses fonctions (Mazzocoli et al., 2010). Des changements morphologiques de la thyroïde ont été observés chez le microcèbe âgé, ce qui suggère une réduction de la sécrétion des hormones thyroïdiennes au cours de la saison de reproduction (JL) (Perret, 1975).

d) Les hormones stéroïdiennes

La sécrétion de cortisol, une hormone stéroïdienne sécrétée par les glandes cortico-surrénales, reste relativement inchangée au cours du vieillissement chez l'Homme. Par contre la déhydroépiandrostérone (DHEA) et le sulfate de déhydroépiandrostérone (S-DHEA), hormones impliquées dans le vieillissement de la peau et des os, et dans la fonction immunitaire (Buford et Willoughby, 2008), sont fortement diminués au cours de l'âge indépendamment du sexe, chez les primates en général, y compris l'Homme (Kemnitz et al., 2000 ; Tannenbaum et al., 2004). Chez le microcèbe, les taux de S-DHEA varient en fonction de l'âge et de la saison et semblent être un bon marqueur du vieillissement. Par exemple, S-DHEA diminue avec l'âge mais uniquement pendant la saison de reproduction. Des études

longitudinales ont démontré que plus la diminution de cette hormone survient tôt et abruptement au cours de la vie de l'animal et plus sa durée de vie sera courte (Perret et Aujard, 2005).

5) Rythmes biologiques et vieillissement

a) Le rythme saisonnier

Chez les mammifères, le vieillissement conduit à une diminution de la réactivité aux variations de la stimulation lumineuse et est caractérisé par une altération de l'alternance veille/sommeil et par une diminution de la vigilance. Peu d'études ont démontré les mécanismes précis sous-jacents aux perturbations de tels rythmes avec l'âge.

Chez le microcèbe, des études ont été menées pour comprendre l'impact du vieillissement sur les rythmes saisonniers de cette espèce et pour tester si des perturbations de ces rythmes pouvaient avoir à leur tour un effet sur les fonctions biologiques de ces animaux. Par exemple une accélération de l'alternance saisonnière (hiver-été), en raccourcissant chaque période et donc la durée d'une année, affecte la survie et la longévité chez le microcèbe (Perret, 1997). En captivité, l'accélération des rythmes saisonniers est obtenue en exposant les animaux à l'alternance de périodes de jours courts et de jours longs sur une périodicité plus courte qu'une année (par exemple, 8 ou 5 mois). Indépendamment du sexe, la durée de vie moyenne est raccourcie d'environ 30% chez les animaux exposés pendant leur vie entière aux cycles accélérés en comparaison aux animaux subissant un cycle annuel photopériodique (Perret, 1997). Cette réduction importante ne s'explique pas par une désynchronisation des rythmes biologiques, ni par une augmentation de la reproduction (fréquence d'accouplement).

Cependant, lorsque l'on considère pour un individu, le nombre de cycles saisonniers vécus plutôt que l'âge chronologique, la durée de vie moyenne est de 5 cycles saisonniers tandis que la durée de vie maximale est atteinte vers 9-10 cycles, indépendamment du sexe et des patrons d'alternance saisonnière (Perret, 1997). Par ailleurs, chez les animaux exposés entre 3 à 5 ans aux photopériodes accélérées, des perturbations marquées des rythmes d'activité locomotrice ont été observées, comparables à celles observées chez les microcèbes âgés subissant des saisons normales (Cayetanot et al., 2005a) (Figure 9).

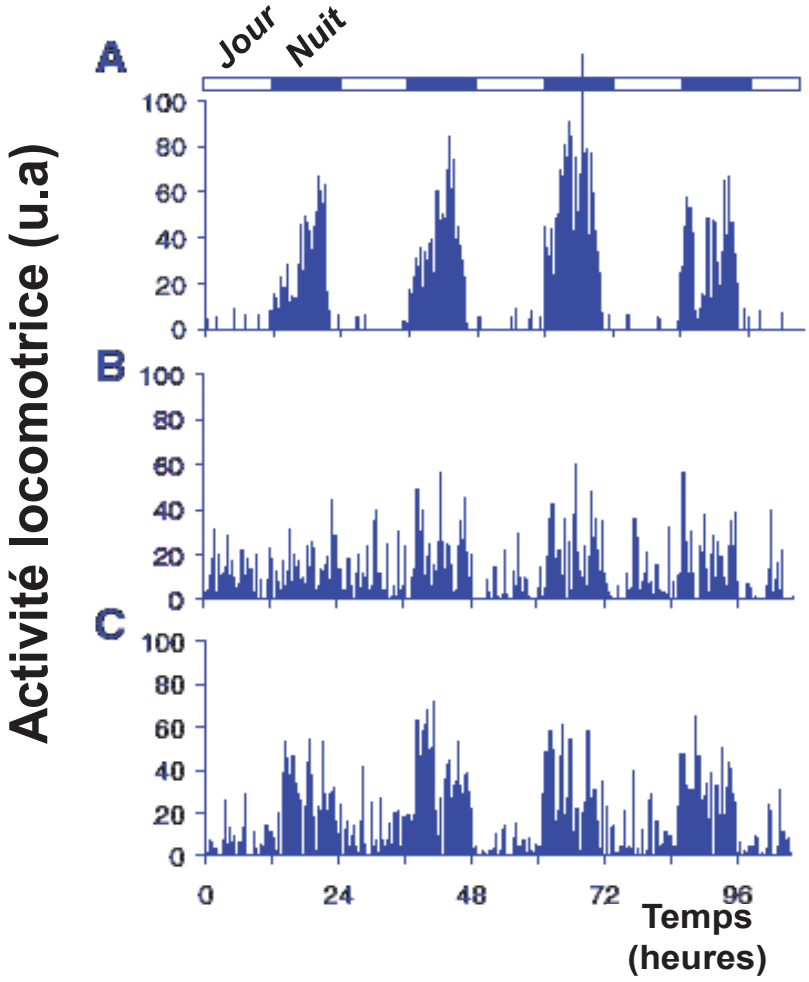


Figure 9. *Représentation graphique des rythmes d'activité locomotrice chez un microcèbe adulte (A), un microcèbe âgé (B), et un microcèbe adulte ayant subi une alternance accélérée des saisons depuis sa naissance (C). Une augmentation de l'activité locomotrice en phase diurne apparaît chez l'animal âgé et est également présente chez le microcèbe dont on a accéléré l'alternance saisonnière. L'activité locomotrice est exprimée en unités arbitraires (u.a). (adaptée de Cayetanot et al., 2005a).*

De la même manière, les animaux exposés à un vieillissement « accéléré » artificiel, présentent des altérations de la production de mélatonine (hormone responsable du rythme veille/sommeil) semblables à celles observées chez des animaux âgés en condition standard (Aujard et al., 2001). Ces résultats suggèrent que chez le microcèbe, comme chez d'autres mammifères « saisonniers », la longévité dépend plus du nombre de cycles photopériodiques que de l'âge chronologique.

b) Le rythme journalier

Chez l'Homme, les rythmes journaliers et notamment le rythme veille/sommeil sont fortement perturbés avec l'âge. Le vieillissement est associé à des modifications dans l'organisation et dans l'amplitude de nombreux rythmes quotidiens (Van Someren et Riemersma-VanDerLek, 2007).

Bien que les microcèbes soient nocturnes, leurs rythmes veille/sommeil se fragmentent avec l'âge comme cela a été observé chez l'Homme (Aujard et al., 2006, Perret et Aujard., 2006). Les microcèbes adultes présentent un rythme circadien marqué avec des niveaux d'activité locomotrice spontanée élevés durant la phase nocturne et une activité pratiquement inexistante en période diurne (Perret et Aujard., 2001) (Figure 9, A). Les individus âgés montrent cependant une augmentation dans leur activité de jour, qui correspond normalement à la phase de repos. De plus, comparés aux adultes, les animaux âgés présentent une anticipation de leur activité locomotrice nocturne.

Des expériences de « free-run » (absence de signaux synchronisateurs, par exemple une alternance lumière-obscurité) ont révélé un raccourcissement de la période endogène chez les animaux âgés, ce qui suggère que le vieillissement influe sur la régulation de l'horloge biologique chez cette espèce (Cayetanot et al., 2005, 2009). Les rythmes journaliers de l'activité locomotrice varient selon la saison, c'est-à-dire que les rythmes circadiens d'activité sont sensibles à la longueur du jour. Bien que des différences liées à l'âge aient été observées lorsque les animaux étaient en période de jours courts, ces variations sont prédominantes en période de jours longs (Aujard et al., 2007).

Les mécanismes qui régissent l'adaptation du microcèbe à l'évolution saisonnière de la longueur du jour semblent donc être perturbés par le vieillissement. Un des marqueurs physiologiques du rythme circadien chez le microcèbe est la mélatonine (6-sulfatoxymélatonine). En effet, la production de mélatonine induit une rythmicité veille/sommeil, elle-même sécrétée par la glande pinéale. Le pic de mélatonine observé au cours de la nuit chez des microcèbes adultes est pratiquement inexistant chez les animaux âgés (Aujard et al., 2001) (Figure 10).

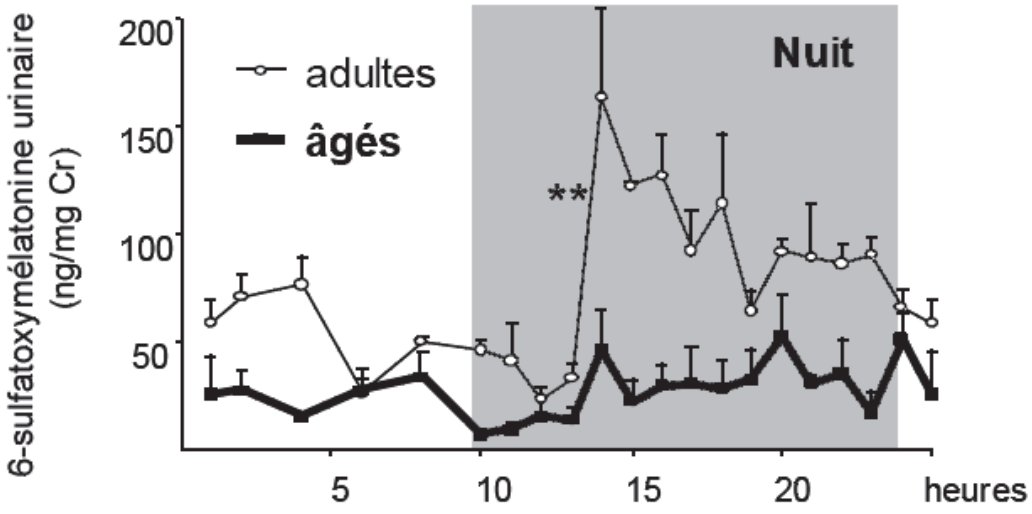


Figure 10. *Variation des taux de 6-sulfatoxymélatonine urinaire chez des microcèbes adultes et âgés. L'augmentation observée au cours de la nuit chez les adultes est quasi-absente chez les animaux âgés (** $p < 0,01$; Cr signifie créatinine).*

De même la variation saisonnière d'expression de cette hormone est minime chez les individus les plus âgés (Perret et al., 2006). Ces résultats soutiennent les observations de diminution avec l'âge d'amplitude saisonnière de la plupart des fonctions biologiques étudiées chez le microcèbe (Aujard et al., 2001; Perret et Aujard, 2006).

D'autres marqueurs physiologiques impliqués dans l'induction des rythmes biologiques chez ce prosimien se sont révélés affectés par le vieillissement et prédictifs des perturbations de l'horloge biologique. L'arginine-vasopressine (AVP) et le peptide intestinal vasoactif (VIP) jouent un rôle clé dans l'horloge biologique. La sécrétion de ces deux peptides chez le microcèbe suit un rythme bien précis avec un pic d'AVP en fin de journée et un pic de VIP durant la nuit. Même si l'amplitude de sécrétion ne semble pas perturbée au cours de l'âge, les pics sécrétoires chez les animaux âgés présentent un décalage de phase avec notamment un pic d'AVP en début de nuit et un pic de VIP en début de jour (Cayetanot et al., 2005). Des résultats confortant ces observations ont été obtenus au cours de l'analyse des perturbations liées à l'âge de l'expression d'une autre protéine importante dans le contrôle des rythmes circadiens, la calbindine (« calcium-binding protein ») (Cayetanot et al., 2007). Enfin, les perturbations rythmiques chez les animaux âgés, en particulier la valeur de la période endogène et le taux de fragmentation des rythmes, ont pu être mises en corrélation avec une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron-γ

(Cayetanot et al., 2009), suggérant des relations entre processus inflammatoires et fonctionnement de l'horloge au cours du vieillissement.

6) Thermorégulation et vieillissement

Bien que la température corporelle soit reconnue en tant que paramètre physiologique cliniquement utile dans le cadre d'infections ou de pathologies, peu d'études utilisent ce marqueur en routine. Cependant, des observations chez l'Homme ont révélé que l'avancée en âge était accompagnée d'un abaissement de la température corporelle. Chez l'animal, la plupart des études en relation avec le vieillissement et la température corporelle ont été effectuées dans le cadre d'une restriction calorique. Ces recherches ont notamment montré chez une variété de mammifères homéothermes que la restriction calorique est associée à la fois à une durée de vie allongée et à une diminution de la température du corps (Rikke et Johnson, 2004). De même en l'absence d'une diminution de la prise alimentaire, il semble exister une relation entre une température corporelle inférieure et une longévité accrue chez la souris (Talan et Ingram, 1986).

Le microcèbe, primate hétérotherme, présente des particularités thermométaboliques qui font de lui un modèle potentiellement unique pour répondre à un ensemble de problématiques concernant la thermorégulation. Il présente des rythmes saisonniers marqués au niveau de la majorité de ses paramètres biologiques (masse corporelle, activité physique…) et est capable de rentrer en torpeur (diminution quotidienne de la température du corps au cours de la première moitié de la phase diurne) qui représente une stratégie d'économie d'énergie durant les périodes de disponibilités réduites des ressources alimentaires (Giroud et al, 2008; Canale et al, 2011).

Ces caractéristiques lui confère une grande plasticité dans la régulation du bilan énergétique pour faire face aux fluctuations et aux contraintes environnementales (Giroud et al, 2008; Canale et al, 2011 ; Terrien et al., 2008, 2009). Les études menées chez les microcèbes tendent à démontrer la flexibilité des réponses thermorégulatrices, notamment au cours du vieillissement. Des expériences conduites chez des animaux adultes ou âgés exposés à différents challenges thermiques ont montré qu'à 25°C, température située dans la zone de thermo-neutralité du microcèbe, les rythmes de température corporelle sont préservés chez les deux groupes d'âge tandis qu'à 12°C les animaux âgés présentent des amplitudes et des fréquences de torpeurs plus importantes (Terrien et al., 2009). Par ailleurs, il existe une corrélation négative entre la profondeur des torpeurs et les taux d'IGF-1 (marqueur de la

balance énergétique) : les taux d'IGF-1 étant plus bas lorsque les torpeurs sont plus profondes (Terrien et al., 2008). Durant ces variations thermiques, les microcèbes âgés présentent des difficultés à maintenir en équilibre leur balance énergétique. Ce déséquilibre énergétique, qui se traduit par une perte de poids chez les animaux âgés, n'est pas dû à une différence de composition corporelle, mais aux coûts énergétiques accrus nécessaires pour résister au froid et permettre le retour à la normo-thermie en sortie de torpeur (Terrien et al., 2009).

Le retour à la normo-thermie suite à la phase de torpeur dépend en grande partie de l'activation de la thermogénèse de non-frisson liée à l'utilisation du tissu adipeux brun. Chez les microcèbes âgés, cette capacité d'activation est maintenue car la morphologie du tissu adipeux brun et la présence d'une protéine découplante (une protéine permettant à l'organisme de produire de la chaleur) ne sont pas modifiées par l'âge. Cependant, des analyses histologiques du tissu adipeux brun obtenues chez des animaux âgés exposés au froid révèlent une réduction des réserves lipidiques, suggérant un déficit d'énergie disponible pour assurer un processus de thermogénèse de non-frisson efficace au cours de l'âge (Terrien et al., 2010).

Cependant, les microcèbes âgés sont capables d'utiliser des stratégies comportementales en réponse à une inefficacité thermorégulatrice. En effet, dans un dispositif expérimental permettant à l'animal de choisir entre différents lieux de repos (nid) matériellement identiques mais qui diffèrent par leur température ambiante, il s'avère que les animaux âgés préfèrent, indépendamment de la photopériode, des températures ambiantes plus élevées que celles choisies par les adultes, limitant ainsi l'amplitude de leurs torpeurs (Aujard et al., 2006).

7) Fonctions sensorielles et vieillissement

Chez l'homme, le déclin des fonctions sensorielles varient en termes de type de fonction, de gravité, d'occurrence, ainsi que de leurs relations avec d'autres symptômes liés au vieillissement. Bien que les troubles des fonctions sensorielles concernent des personnes de tout âge, la prévalence et la complexité de ces troubles augmentent avec l'âge. Ils peuvent ainsi être considérés comme un processus dynamique qui varie dans le temps plutôt que comme un événement qui survient puis qui reste stable dans le temps (Nusbaum., 1999).

a) La vision

Bien qu'aucune anomalie rétinienne (dégénérescence, atrophie) n'ai été observée dans les yeux de microcèbes adultes ou âgés (Beltran et al., 2007), la cataracte est une lésion oculaire fréquemment rencontrée chez les microcèbes âgés. Ainsi, une étude portant sur 220 individus de tous les âges, en captivité, à démontré que la moitié des animaux âgés de 7 ans était atteint de cataractes (uni- ou bilatérales) et que le plus jeune microcèbe atteint était âgé de 3,5 ans (Beltran et al., 2007).

b) L'olfaction

Il existe de nombreuses causes anatomiques et physiologiques responsables du déclin olfactif avec l'âge (voir pour revue Boyce et Shone, 2006). Même en l'absence de pathologie, les neurones olfactifs dégénèrent (apoptose) avec un taux relativement élevé chez les mammifères et bien que ces derniers aient la capacité de remplacer ces cellules (neurogénése olfactive), ce processus dégénère avec l'âge (Nunez-Para et al., 2011). Il en résulte une réduction de la surface de l'épithélium olfactif, avec un nombre réduit de neurones olfactifs.

Le microcèbe offre un exemple unique de l'existence d'une physiologie modulée par des phéromones (organe olfactif secondaire voméronasal), notamment en période de reproduction (Schilling et al., 1984). Par conséquent, plusieurs études se sont intéressées à l'effet de l'âge sur les spécificités chimio-sensorielles de cette espèce. Avec l'âge, les mâles diminuent leurs comportements sexuels comme le « reniflage » et le « léchage » des organes génitaux des femelles, ainsi qu'une diminution des comportements de marquage urinaire (Aujard et Perret, 1998). Par ailleurs, une diminution progressive mais notoire de la sensibilité olfactive a été démontrée avec l'âge chez des mâles exposés à des urines de femelles en pro-œstrus (Aujard et Nemoz-Bertholet, 2004). Le fait que les taux d'hormone sexuelle (testostérone) chez les mâles âgés ne soient plus stimulés par les odeurs de femelles en pro-œstrus, alors que c'est le cas chez les mâles adultes, confirme que l'absence d'effet des phéromones sur la fonction sexuelle des primates âgés est clairement liée à une altération de la reconnaissance de ces molécules par l'organe voméronasal, démontrant une déficience du traitement des informations olfactives.

Dans l'ensemble, les déficits des perceptions sensorielles au cours du vieillissement expliquent en grande partie les modifications comportementales observées chez les animaux âgés. L'affaiblissement sensoriel se traduit également par une baisse de fréquence des

comportements sociaux faisant apparaître une tendance à l'isolement social chez les microcèbes âgés (Picq, 1992).

8) Performances motrices

Des études chez l'Homme ont montré un déclin général des performances motrices et surtout de l'équilibre avec l'âge et les tests de performances physiques sont désormais inévitables et systématiques dans le cadre d'études longitudinales sur le suivi de cohortes (saines ou malades) (voir pour revue Gill, 2010).

Chez les microcèbes, les animaux âgés (>6 ans) se déplacent avec plus de difficultés en comparaison avec des animaux jeunes (<3 ans) ou adultes (3-4 ans) (Nemoz-Bertholet et Aujard, 2003). La coordination motrice et l'endurance, classiquement mesurées en plaçant l'animal sur un cylindre rotatif qui accélère progressivement (rotarod), diminuent dès l'âge de 4 ans (Nemoz-Bertholet et Aujard, 2003). Ce déclin lié à l'âge n'est observé que pendant la période de jours longs, car les microcèbes ont de manière générale des performances amoindries durant les jours courts (Nemoz-Bertholet et al., 2004) (Figure 11).

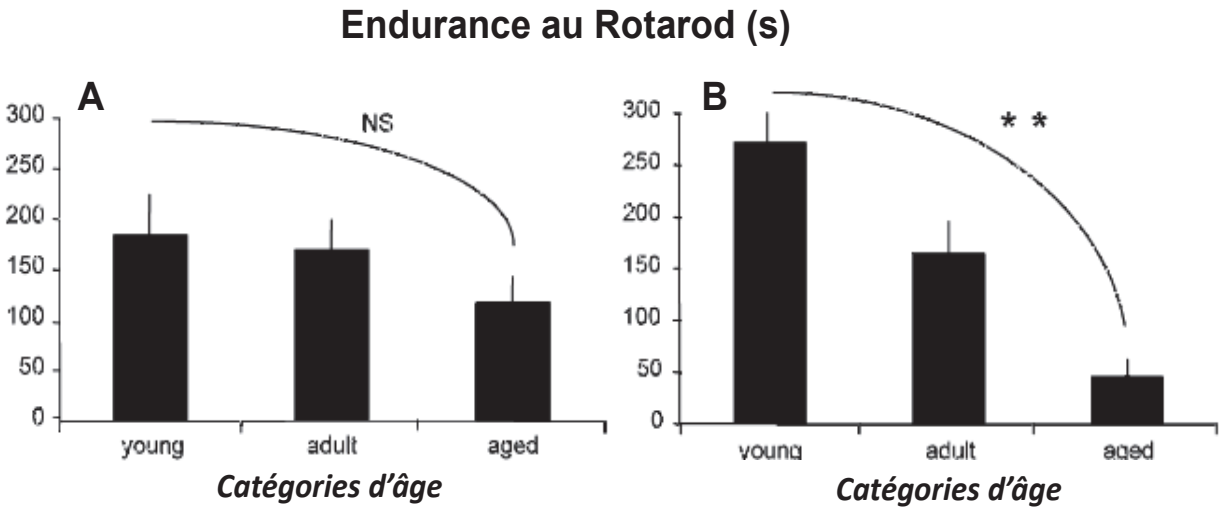


Figure 11. *Endurance au Rotarod chez des microcèbes jeunes (<3 ans), adultes (3-4 ans) et âgés (>6ans) exposés à des jours courts (A) ou à des jours longs (B). Le déclin lié à l'âge n'est observé que pendant la période de jours longs. (adaptée de Nemoz-Bertholet et al., 2004).*

De même, les variations journalières des performances motrices, très marquées chez les individus adultes, s'amenuisent avec l'âge, reflétant des altérations dans l'organisation rythmique chez les animaux âgés.

9) Performances cognitives et vieillissement

Il est admis que le vieillissement humain est souvent accompagné d'une modification de nombreux aspects du comportement d'une part et des capacités cognitives d'autre part. L'âge est effectivement associé à une diminution progressive des capacités mnésiques avec une forte hétérogénéité entre individus. Mais tous les types de mémoire ne sont pas affectés de la même façon avec l'avancée en âge. La mémoire déclarative et les fonctions exécutives sont les plus altérées, tandis que la mémoire procédurale semble conservée. Bien que ces pertes de fonctions soient bien décrites dans la littérature, chez un ensemble de modèles animaux dont l'Homme, les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus et les modèles expérimentaux d'études présentent souvent des limites d'utilisation ne reflétant pas ce qui se passe chez l'Homme, notamment dû à leurs systèmes nerveux moins développés que ce dernier.

En raison de la similitude de leurs structures cérébrales avec celles de l'Homme, les primates non-humains sont considérés comme des modèles pertinents et essentiels pour une meilleure compréhension des déficits cognitifs qui surviennent avec l'âge ainsi que du rôle de régions cérébrales spécifiques.

Chez le microcèbe, des protocoles expérimentaux ont été mis en place pour évaluer diverses capacités mnésiques, se rapprochant le plus possible des tests effectués chez l'Homme. Ces tests ont permis de mesurer la mémoire de reconnaissance, la mémoire spatiale de travail, la mémoire spatiale de référence, la mémoire associative ainsi que les capacités de renversement d'apprentissage. Chacun de ces tests est détaillé ci-après.

a) Discrimination

De nombreuses versions de tâches de discrimination ont été utilisées pour évaluer les capacités cognitives chez le microcèbe en présence d'indices olfactifs, visuels ou spatiaux (Joly et al., 2006; Picq, 2007). Les tâches de discrimination successive de type go/no-go exigent que l'animal émette une réponse (motrice) en présence d'un indice A (ex : entrer dans

un couloir éclairé pour accéder à une récompense) et aucune réponse en présence d'un autre indice B (ex : ne pas rentrer dans un couloir non-éclairé). Avec l'avancée en âge, aucun déficit n'a été observé chez les animaux âgés, démontrant que les processus cognitifs sous-jacents à la simple association d'un stimulus à une récompense sont conservés au cours du vieillissement (Joly et al., 2006; Picq, 2007).

Une tâche de généralisation, effectuée après une tâche de discrimination visuelle simple, a montré que certains microcèbes âgés (environ 45%) ont des difficultés à généraliser les indices visuo-spatiaux par rapport à un précédent apprentissage. La capacité à (ré)-utiliser des informations acquises précédemment semble donc perturbée avec l'avancée en âge.

Une tâche de discrimination guidée par une règle spatiale a également été réalisée: à chaque essai, les microcèbes sont confrontés à un choix entre une paire de couloirs (les individus sont testés sur des paires différentes de couloirs, aléatoirement de valence positive ou négative). La valence d'un couloir est déterminée par sa position spatiale par rapport à l'autre couloir (Picq, 2007). Pour cette tâche, environ 30% des animaux âgés présentent une forte altération de leur performance pour ce test qui exige une « discrimination » entre deux éléments (les deux couloirs d'une paire) et de la flexibilité puisque la valence peut être inversée d'un essai sur l'autre, plus délicat que dans une tâche de discrimination simple (Picq, 2007).

b) Mémoire de reconnaissance

La capacité à reconnaître un objet, une odeur ou même un individu parmi d'autres peut être étudiée de manière continue au cours de la vie chez de nombreuses espèces animales. Dans une tâche de non-appariement différé de stimulus, l'animal doit retenir des informations spécifiques à chaque essai (avec des délais de rétention variables) et apprendre la règle de non-appariement (Ridley et Baker, 1991).

Dans une version « spatiale » de cette tâche de mémoire de reconnaissance, le microcèbe doit apprendre à entrer dans le « nouveau » couloir pour atteindre la récompense. Les microcèbes âgés ne présentent de déficit dans l'acquisition de cette règle, mais environ 40% d'entre eux expriment un déficit de rétention lorsque le délai entre chaque essai augmente (Dhenain et al., 1998).

Dans une tâche d'exploration libre d'objets, les animaux âgés présentent des difficultés à mémoriser de nouveaux objets dans un environnement complexe et changeant (Picq et Dhenain, 1998). De plus, les individus âgés ne semblent pas reconnaître les objets familiers

qui ont changé de place, probablement dû à un déficit de la mémorisation des positions spatiales des objets par rapport à l'environnement (Picq et Dhenain, 1998).

c) Mémoire spatiale de travail

Alors que les microcèbes vieillissant n'ont pas de difficulté à apprendre et à mémoriser des associations simples entre stimulus et récompense (discrimination simple), ils présentent des performances amoindries lorsqu'il y a un délai imposé entre la présentation du stimulus et la réponse (Picq, 1995). Cela suggère une altération sévère liée à l'âge au niveau de la mémoire de travail (mémoire à court terme de l'ordre de la seconde/minute). De plus, ce type de mémoire a également été évalué dans une tâche spatiale (labyrinthe à trois panneaux) où les animaux doivent passer dans des couloirs successifs associés à trois panneaux, dont deux sont toujours fermés. Ainsi les animaux doivent mémoriser une série de trois panneaux afin d'accéder à la récompense ; l'enchaînement des couloirs reste constant au cours d'une session mais change quotidiennement (Trouche et al., 2010). Les individus adultes exhibent un niveau plus élevé d'erreurs de persévérance par rapport aux animaux âgés. Ce comportement est probablement dû au niveau élevé d'anxiété des adultes exposés à un nouvel environnement (Picq, 1993a; Nemoz-Bertholet et Aujard, 2003). A l'inverse, les microcèbes âgés ont montré une accoutumance rapide à cette tâche même si au final ils font plus d'erreurs de mémoire de travail (et de référence) par rapport aux individus adultes qui eux ont amélioré rapidement leurs performances avec le temps.

d) Mémoire spatiale de référence

Ce type de mémoire (à long terme) a été évalué grâce à la tâche de la plateforme circulaire et grâce à la tâche du labyrinthe radial, adaptées à cette espèce. La tâche de la plateforme circulaire, adaptée du labyrinthe de Barnes communément utilisé chez les rongeurs, permet de tester la mémoire spatiale de référence et la navigation spatiale. L'animal doit se servir d'indices allocentriques pour atteindre la bonne sortie, positionnée au hasard parmi 12 trous (1 ouvert, et 11 fermés) (Picq et al., 2012). Tout d'abord les résultats indiquent une grande variabilité individuelle : certains des animaux âgés (environ 60%) présentent des performances comparables à celles d'individus adultes tandis que d'autres semblent avoir des performances fortement altérées.

Par ailleurs, dans le labyrinthe radial à 8 bras, quatre des huit bras amènent à une récompense si l'animal les emprunte, tandis que les quatre autres sont fermés pour tester leur mémoire de référence. Pendant un essai donné, les animaux doivent se souvenir des couloirs empruntés auparavant (Picq, 1993b). Les animaux adultes et âgés ont mémorisé la position des bras fermés avec des performances similaires (mémoire de référence). Cependant les microcèbes âgés présentent des performances amoindries quand il s'agit de visiter alternativement les bras renforcés, sans répétition. Cela soutient le fait que le vieillissement détériore la mémoire de travail, mais pas la mémoire spatiale de référence (affectée que chez certains individus).

e) Fonctions exécutives

Les fonctions exécutives ont été évaluées en testant les effets de changements intra-et extra-dimensionnels sur les performances de discrimination visuo-spatiale (Picq, 2007; Picq et al, 2012). Après une tâche de discrimination visuelle, les microcèbes ont eu à effectuer une tâche au cours de laquelle l'association stimulus-récompense a été inversée, par exemple le couloir non-éclairé précédemment non associé à une récompense étant maintenant associé à la récompense. Puis les microcèbes ont été testés dans une tâche de renversement extra-dimensionnel du stimulus discriminant : le stimulus positif est devenu le couloir de droite, quel que soit son état de luminosité (éclairé ou non-éclairé), ce qui nécessite un changement dans l'attention de l'animal, passant d'un stimulus visuel (lumière) à un stimulus spatial (gauche-droite). Enfin, les animaux ont été testés dans une tâche de « renversement » de la discrimination spatiale: le couloir sur la gauche étant désormais le stimulus positif. Les performances de discrimination visuelle observées chez les microcèbes étaient similaires, indépendamment de l'âge des animaux. Mais sur les tâches successives de renversement, les capacités des individus âgés étaient significativement altérées. Tous les animaux âgés présentaient des performances très faibles par rapport aux adultes (Picq, 2007; Picq et al, 2012). Ces résultats montrent que les difficultés rencontrées sont certainement dues à une diminution de la plasticité des réponses avec l'âge, largement décrite chez de nombreuses espèces dont l'Homme (Barense et al,. 2002; Moore et al, 2003). Ces résultats sont cohérents avec d'autres observations obtenues lors de tâches de discrimination olfactive et de renversement de l'association stimulus-récompense faisant apparaître une forte déficience cognitive chez un sous-groupe de microcèbes âgés (Joly et al., 2006).

En conclusion, les études des fonctions cognitives chez le microcèbe nous indiquent que : i) la capacité à former de simples associations stimulus-récompense (mémoire procédurale) est préservée au cours du vieillissement. ii) la mémoire de travail et les capacités d'adaptation aux changements rapides de stratégie (fonctions exécutives) sont fortement impactées avec l'avancée en âge chez cette espèce. iii) la mémoire spatiale de référence est également perturbée chez la plupart des microcèbes âgés, mémoire qui peut être apparentée à la mémoire déclarative. L'ensemble de ces résultats suggère une sensibilité sélective au cours du vieillissement, des différentes structures neuronales impliquées dans ces fonctions cognitives.

Ces études comportementales montrent que les microcèbes révèlent des similarités non négligeables en comparaison au vieillissement cognitif décrit chez l'Homme, à savoir une mémoire procédurale épargnée, un déclin progressif et généralisé des fonctions exécutives et une mémoire déclarative affectée pour une sous-population d'individus âgés. Tous les microcèbes âgés ne sont pas affectés par ce déclin et certains font même aussi bien que des individus adultes, ceci étant dû en partie au fait que la variabilité inter- et intra-individuelle augmente avec l'âge (Valdois et al., 1990; Rapp et Amaral, 1992). Finalement le microcèbe offre la possibilité d'identifier des corrélats biologiques, physiologiques ou bien encore neuronaux de la réussite cognitive chez les adultes par rapport aux facultés affaiblies chez les animaux vieillissants.

10) Altérations cérébrales et neuropathies

Chez l'Homme, au cours du vieillissement normal, une atrophie cérébrale survient principalement au niveau des régions frontales du cerveau (Raz et al, 2005; Kalpouzos et al, 2009), ainsi qu'au niveau du noyau caudé (Raz et al., 2005). Une altération de la substance blanche, principalement composée des axones des neurones myélinisés, est également décrite dans certaines études (Resnick et al, 2003; Good et al., 2001). Lors d'un vieillissement pathologique de type neurodégénératif comme la maladie d'Alzheimer, les altérations sont d'abord détectées au niveau de l'hippocampe et du cortex cingulaire (Chetelat et al., 2002).

Chez le microcèbe, des études histologiques ont montré que certains individus âgés présentent une atrophie de régions spécifiques du cerveau telles que la matière blanche et la matière grise corticales (composées des corps cellulaires des neurones), l'hippocampe, les noyaux gris centraux, le tronc cérébral et le cervelet (Bons et al., 1992). L'atrophie la plus marquée est observée dans le cortex, qui est accompagnée par un élargissement important des

ventricules latéraux (renfermant du liquide céphalorachidien) par rapport aux animaux adultes où ces cavités sont limitées (Bons et al., 1992).

L'imagerie par résonance magnétique (IRM), méthode non invasive d'exploration de l'anatomie cérébrale, a également été utilisée pour évaluer l'atrophie cérébrale chez le microcèbe (Dhenain et al., 2000). Le processus de l'atrophie a été bien caractérisée chez cette espèce et commence entre 5 et 8 ans chez certains animaux, avec une évolution rapide dans certains cas (Dhenain et al., 2000).

L'atrophie cérébrale chez le microcèbe conduit à l'accumulation de liquide céphalo-rachidien selon une évolution précise. En premier lieu dans les régions frontales pericorticales, puis dans les régions pariétale et temporale et enfin dans toutes les régions pericorticales (Dhenain et al, 2003; Kraska et al, 2011) (Figure 12).

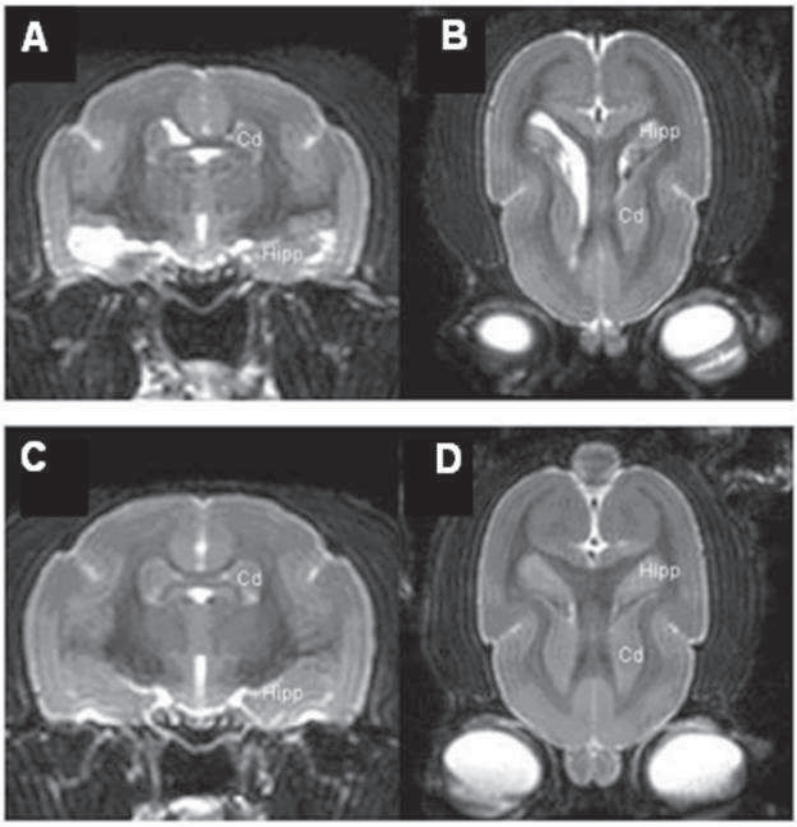


Figure 12. *Profils coronaux (A-C) et horizontaux (B-D) de cerveaux de microcèbe réalisés par acquisition IRM in vivo. A-B. Structures cérébrales atrophiées avec accumulation de liquide céphalo-rachidien près de l'hippocampe (Hipp) et du noyau caudé (Cd). C-D. Profil d'un animal sans aucun processus d'atrophie cérébrale. (adaptée de Joseph-Maturin et al., 2010).*

Ces observations sont compatibles avec une progression de l'atrophie cérébrale : commençant dans des régions délimitées et précises pour s'étendre à l'ensemble du cerveau. Une étude plus récente a évalué la localisation précise des tissus atrophiés. Elle révèle une atrophie sévère au niveau du noyau caudé et de la substance blanche de l'ensemble des animaux âgés (Picq et al., 2010). Parce que l'atrophie de ces régions se produit chez tous les animaux âgés, avec une forte corrélation avec l'âge chronologique, elle est admise comme un processus du vieillissement normal chez le microcèbe.

Une atrophie corticale a également été détectée au niveau du cortex cingulaire, occipital, et temporal (incluant l'entorhinal). D'autre part, dans certaines régions, à savoir l'hippocampe et le septum, l'atrophie ne porte que sur une minorité d'animaux, ce qui suggère qu'elle est davantage liée au vieillissement pathologique.

Récemment, une relation a été mise en évidence entre l'atrophie de certaines régions cérébrales et les performances cognitives chez le microcèbe âgé. Ainsi, les performances aux tâches de mémoire spatiale de référence et de renversement sont fortement corrélées au niveau d'atrophie de l'hippocampe, du cortex entorhinal et du septum (Picq et al., 2010) (Figure 13). Une telle relation entre déclin des performances cognitives et atrophie de certaines régions cérébrales n'a jamais été décrite auparavant chez des espèces de primates non humains.

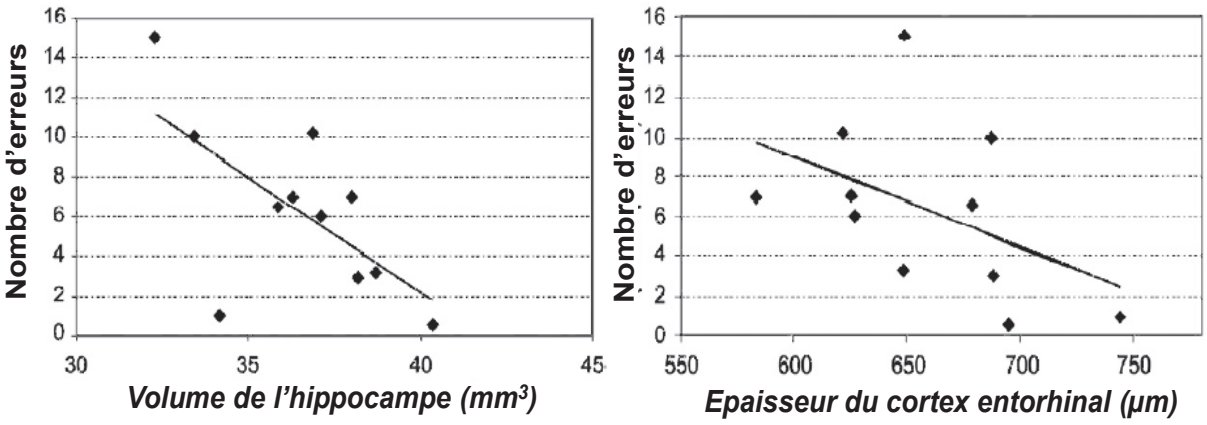


Figure 13. *Régressions linaires montrant la relation entre les performances cognitives et l'atrophie cérébrale de structures spécifiques chez le microcèbe âgé. Le nombre d'erreurs avant d'atteindre la bonne sortie au test de la plateforme circulaire (mémoire spatiale de référence) est corrélé au volume de l'hippocampe et à l'épaisseur du cortex enthorinal chez les microcèbes âgés. (Adaptée de Picq et al., 2010).*

Cependant les lésions tissulaires sous-jacentes au processus d'atrophie chez le microcèbe sont encore peu connues. Une étude récente a suggéré un lien entre l'atrophie cérébrale et le dépôt de protéines amyloïdes intracellulaires (Kraska et al., 2011). La mise en évidence de plaques séniles et de changements neurofibrillaires dans le cerveau de microcèbes âgés (Bons et al., 1992) a été un élément déterminant pour l'utilisation de cet animal dans les recherches sur le vieillissement et, potentiellement, comme modèle des atteintes cérébrales neurodégénératives, et plus particulièrement de la maladie d'Alzheimer.

Parallèlement à la mise en évidence des plaques ß-amyloïdes chez le microcèbe, la protéine Tau (Tubule associated unit) s'est également révélée être présente dans le cerveau de certains microcèbes. Cette protéine, dont la principale fonction est d'interagir avec la tubuline afin de moduler la stabilité des microtubules des axones des neurones, a tendance à former des agrégats anormaux lors de la dégradation des neurones, observés dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Chez le microcèbe, le poids moléculaire de cette protéine augmente avec l'âge en raison d'un changement de conformation spatiale tridimensionnelle et d'une hyper-phosphorylation (Delacourte et al., 1995); elle forme alors des agrégats stables. Les études immunohistochimiques ont confirmé la présence de ces agrégats au niveau des dépôts de plaques ß amyloïdes dans le cerveau de microcèbes âgés (Bons et al., 1995). Par ailleurs, la diminution de l'activité de neurotransmission, particuliérement cholinergique et serotoninergique, mise en évidence chez l'Homme au cours du processus de vieillissement pathologique, a également été mise en évidence chez le microcèbe (Dournaud et al., 1994 ; Jallageas et al., 1998).

En résumé, les bio-marqueurs explorés grâce à la méthode IRM peuvent donc être utilisés pour suivre les microcèbes au cours du vieillissement pour ainsi identifier les individus âgés présentant des altérations cérébrales. De manière complémentaire, les analyses *post-mortem* par immunohistologie permettent de confirmer les pronostics de neuropathologie obtenus par IRM et apportent des informations mécanistiques.

Figure 14. Bilan

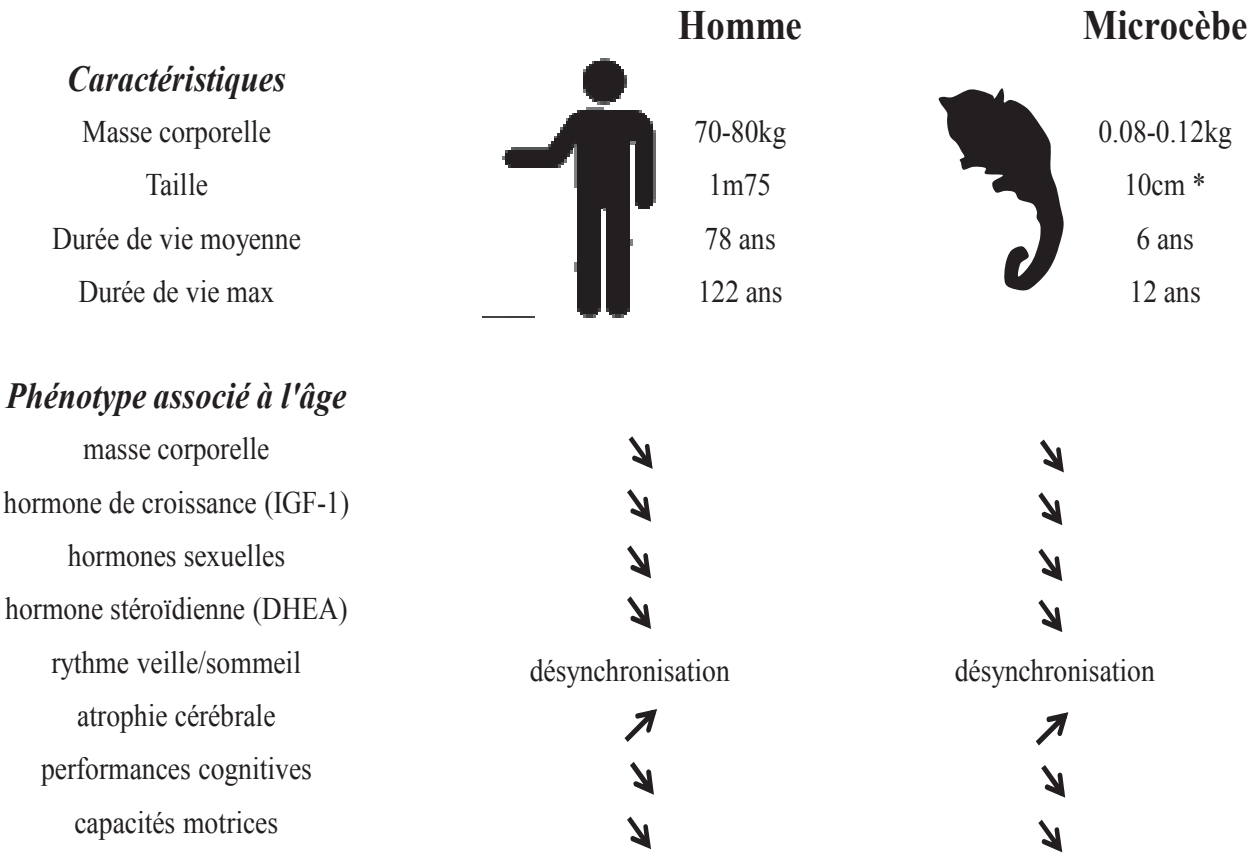


Figure 14. *Similitudes dans l'évolution de marqueurs biologiques du vieillissement chez l'Homme et chez le microcèbe. IGF-1(insulin like growth factor 1) ; DHEA (déhydroépiandrostérone).* taille du microcèbe sans la queue.*

En conclusion, le Microcèbe représente un modèle pertinent pour les études sur le vieillissement. Ce primate non-humain offre la possibilité de suivre plusieurs marqueurs physiologiques et comportementaux, de manière longitudinale et d'obtenir des résultats sur une échelle de temps raisonnable au vu de sa durée de vie maximale de 12 ans en captivité. L'atout majeur de cette espèce pour une potentielle translation des résultats à l'Homme est la forte similarité retrouvée dans l'évolution des marqueurs biologiques au cours du vieillissement.

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

I) Le projet RESTRIKAL : contexte d'étude

La population mondiale vieillit, particulièrement dans les pays développés. L'espérance de vie moyenne de l'Homme ne cesse d'augmenter et les projections considèrent qu'en 2050 les personnes âgées de plus de 85 ans représenteront environ 5% de la population. Cette évolution a et aura un impact sur quasiment tous les aspects de notre vie.

Cependant l'augmentation de la durée de vie est un objectif raisonnable chez l'Homme si, et seulement si, elle s'accompagne d'une augmentation en parallèle de la qualité de vie qui dépend essentiellement du maintien à un niveau stable des grandes fonctions de l'organisme.

Une des voies d'approche repose sur la mise en place de stratégies pour prévenir le déclin des fonctions cognitives et l'apparition de certaines pathologies chroniques liées à l'âge. Parmi ces protocoles, la restriction calorique sans malnutrition est à l'heure actuelle la seule intervention non génétique qui augmente significativement la longévité d'espèces animales à durée de vie courte (levures, nématodes, rongeurs) et qui retarde l'apparition de pathologies liées à l'âge.

Par ailleurs, le resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène), molécule présente en grande quantité dans le vin rouge, est connu pour ses vertus thérapeutiques: anti-oxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Un des intérêts pour l'utilisation de ce composé naturel provient du fait que les effets qu'il induit chez de nombreuses espèces semblent mimer certains des effets bénéfiques produits par une restriction calorique. Ainsi, les voies de signalisation engagées dans la réponse à une restriction calorique ou à un apport en resvératrol seraient potentiellement les mêmes.

Pour la première fois, ces protocoles «anti-vieillissement» à long terme ont été mis en place chez un primate non humain, le microcèbe (*Microcebus murinus*). En effet, les altérations physiologiques et comportementales au cours du vieillissement chez cette espèce sont comparables à celles observées chez l'Homme.

Notre équipe « Mécanismes Adaptatifs et Evolution » et ses collaborateurs, est actuellement la seule à effectuer une étude longitudinale réunissant ces deux protocoles chez un primate. Cette étude, intégrant plus de 50 animaux, intitulée «RESTRIKAL» et financée dans le cadre du Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine (projet ANR-06-PNRA-010-01) est en cours depuis janvier 2007.

1) Elevage et conditions de captivité

La colonie de Brunoy, UMR MNHN/CNRS 7179, compte environ 500 microcèbes descendants d'individus importés du Sud de Madagascar entre 1967 et 1972 et répartis en différents groupes d'âge suivant le sexe. La production d'environ 80 - 100 jeunes par an assure un renouvellement constant des effectifs. Il n'y a pas de « ménopause » et la fécondité des femelles reste constante, en moyenne 2 jeunes par saison de reproduction. Cet élevage fonctionne maintenant depuis plus de 45 ans et il s'est considérablement développé en raison de la multiplication des demandes nationales et internationales pour des recherches sur ce primate dans tous les domaines de la biologie, avec des approches évolutives dans la lignée des primates ainsi que celle des mammifères. Il faut également souligner que la connaissance très précise des contraintes sociales nécessaires à l'expression des capacités reproductrices de cette espèce a permis de maintenir le capital génétique de la colonie captive à un niveau équivalent à celui des populations naturelles. En élevage, les microcèbes sont soumis à des conditions standards de captivité : une température constante de 24-26°C, une humidité relative de 55%, une exposition à des rythmes saisonniers artificiels et alternés de jours courts (JC : 10h de jour pour 14h de nuit) et de jours longs (JL : 14h de jour pour 10h de nuit) sous une lumière froide (250-350 lux).

Une cohorte de 53 microcèbes mâles a été constituée en janvier 2007 à partir de l'élevage de Brunoy, dans le cadre du projet RESTRIKAL. Les animaux sont soumis à des conditions standards comme dans l'élevage: une température ambiante de 24-26°C et une hygrométrie constante de 55%. Les variations saisonnières de photopériode sont simulées sous lumière artificielle afin d'alterner six mois de photopériode longue (JL (long-day, LD en anglais) : 14h de lumière/jour) et six mois de photopériode courte (JC (short-day, SD en anglais): 10h de lumière/jour). Chaque animal est isolé dans une cage individuelle munie de nichoirs en bois et de branchages. Les animaux ont été intégrés à l'âge adulte (3 ans) et ont été assignés à différents groupes de la manière suivante: un groupe contrôle (CTL) nourri *ad libitum*, un groupe sous restriction calorique nourri à 70% par rapport à la ration des CTL et, un groupe nourri *ad libitum* et supplémenté avec 200 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ de resvératrol. Les animaux sont nourris chaque jour avec une alimentation standardisée à base de fruits frais (banane et pomme) et d'un mélange protéique à base de lait concentré, de céréales, de fromage blanc, de jaune d'œuf et de pain d'épices. Les apports énergétiques de cette alimentation sont d'environ : 50% de glucides, 30% de lipides et 20% de protides, pour une charge calorique de 1,14 Kcal/g. L'eau est fournie chaque jour à volonté. Les animaux CTL

reçoivent quotidiennement une ration de 15g de bouillie ainsi que 6 g de banane. Les restes laissés par les animaux sont pesés de manière journalière afin de calculer les calories ingérées individuellement.

2) Démarche expérimentale

L'approche multifactorielle développée dans ces travaux de recherche est entièrement basée sur une étude longitudinale permettant de révéler les réponses adaptatives du microcèbe soumis à différents traitements alimentaires et ce à partir de l'âge adulte jusqu'à la mort naturelle (Figure 1).

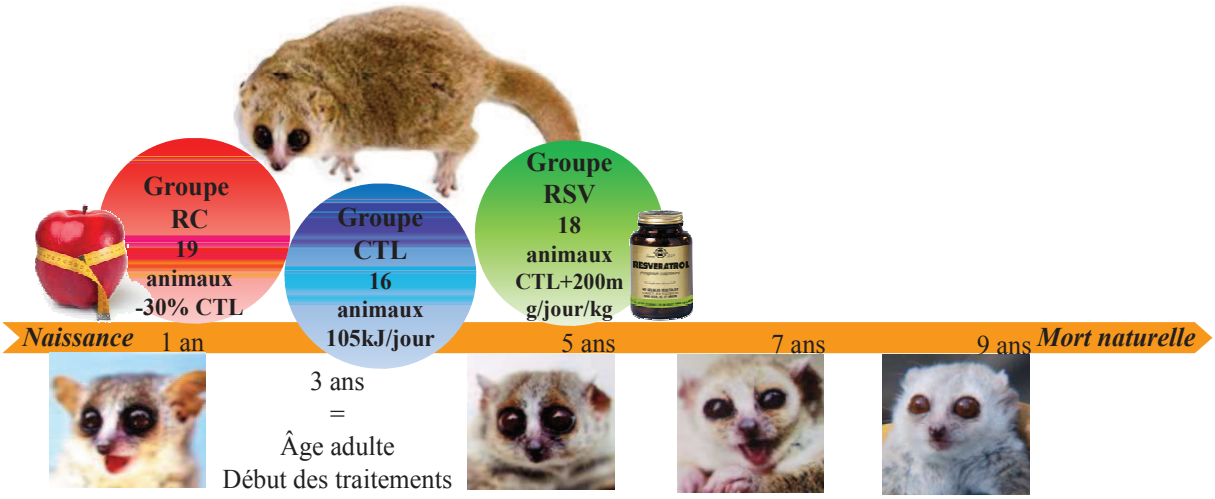


Figure 1. *Schéma de la démarche expérimentale représentant le suivi longitudinal du projet RESTRIKAL. Les traitements CTL : contrôle, RC : restriction calorique et RSV : supplémentation alimentaire en resvératrol sont commencés à l'âge adulte, lorsque les animaux ont trois ans (38±1mois).*

Depuis le début du projet RESTRIKAL, un panel de tests a été réalisé sur les microcèbes à intervalles de temps réguliers depuis l'âge adulte et jusqu'à leur mort naturelle afin d'évaluer l'impact de ces traitements sur les processus de vieillissement et les modifications de la balance énergétique. Ces tests, appropriés pour ce type d'étude longitudinale et permettant de mettre en évidence le vieillissement chez le microcèbe, ont été choisis en raison de leur aspect non-invasif pour éviter au maximum les perturbations des réponses physiologiques et comportementales.

De même les paramètres d'étude ont été organisés selon une chronologie précise, en fonction de plusieurs facteurs (Figure 2):

- Suivi des paramètres selon des pas de temps réguliers, d'une année sur l'autre
- Définition des protocoles expérimentaux en fonction des différentes phases de réponse des rythmes biologiques au cours du cycle photopériodique artificiel
- Suivi des paramètres comportementaux et évaluation de l'atrophie cérébrale par IRM une fois par an
- Pas de suivi juste après un changement de photopériode pour favoriser le retour à un état physiologique stable, *a priori* perturbé par la transition saisonnière
- Respect de la fréquence des prélèvements biologiques en fonctions de l'état de santé général individuel (espacement minimum d'une semaine entre deux prélévements sanguins)
- Suivi hebdomadaire de marqueurs du bien-être animal, à savoir la masse corporelle et la prise alimentaire.

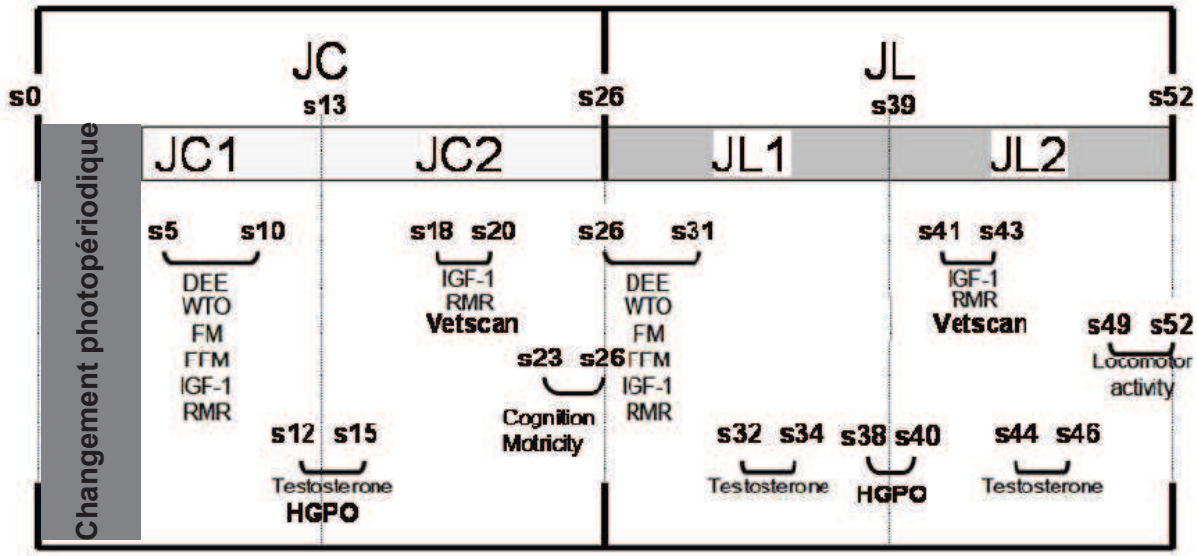


Figure 2. *Représentation chronologique des expériences pour une année « type » du projet RESTRIKAL. Pendant les quatre premières semaines de chaque période de jours courts (JC), aucune expérience n'a été réalisée pour permettre aux animaux d'atteindre leur poids d'hiver (engraissement, zone grisée). Certains paramètres tels que DEE, WTO, FM et FFM, Vetscan et HGPO ont été suivis et mesurés deux fois par an. Les mesures du taux d'IGF-1 plasmatique et du métabolisme de repos (RMR) ont eu lieu quatre fois par an. Les capacités motrices et cognitives ont été testées une fois par an, en fin de jours courts et juste avant l'entrée en jours*

longs (s : semaine, JC : jours courts, JL : jours longs, DEE (daily energy expenditure) : dépense énergétique totale, FM (fat mass) : évaluation de la masse grasse, FFM (fat free mass) : évaluation de la masse maigre, HGPO : hyperglycémie provoquée orale, IGF-1 : insulin like growth factor 1, RMR (resting metabolic rate) : métabolisme de repos, Vetscan : analyse des marqueurs sanguins du métabolisme hépatique, WTO (water turnover) : turnover hydrique). (adaptée de Dal-Pan et al., 2011).

Expériences	Saison	Fréquence annuelle
Prise alimentaire	JC/JL	journaliére
Masse corporelle	JC/JL	journaliére
Métabolisme basal	JC/JL	x4
IGF-1	JC/JL	x4
Testostérone	JC/JL	x3
Composition corporelle	JC/JL	x2
Dépense énergétique	JC/JL	x2
Glycémie (HGPO)	JC/JL	x2
Marqueurs hépatiques (Vetscan)	JC/JL	x2
Activité locomotrice	JC/JL	x2
Cortisol/créatinine	JC/JL	x2
Insuline (à jeun)	JC/JL	x2
Tests cognitifs	JC	x1
Tests moteurs	JC	x1
Anxiété	JC	x1
Atrophie cérébrale	JC	x1

Figure 3. *Représentation décroissante de la fréquence de chaque expérience menée au cours du projet RESTRIKAL (fréquence par saison et fréquence annuelle).*

Les méthodes et techniques qui ont permis de suivre à court, moyen et long terme les paramètres physiologiques et comportementaux sont décrites en détail par la suite dans les chapitres concernés.

II) Bilan des résultats publiés du projet RESTRIKAL

1) Réponses adaptatives aux traitements à court terme

Un premier bilan a été effectué après un an de suivi afin de voir si les régimes imposés étaient capables d'induire des effets sur l'organisme des microcèbes (Dal-Pan et al. 2011, **Article 2**, **Annexe A**). Aucun impact des régimes n'a été observé concernant la « bonne santé » des animaux traités comparés aux CTL. Le poids des animaux, fortement marqué par les rythmes saisonniers, ne présentait pas de différence significative entre les différents traitements en période hivernale. Cependant les animaux en RC avaient un poids significativement plus bas que ceux des RSV et des CTL en période estivale. L'étude de la composition corporelle chez ces animaux n'a pas montré de modification quel que soit le régime suivi. Par ailleurs, les RC ont montré une diminution de leur dépense énergétique sans pour autant changer leur métabolisme de repos comparés aux CTL, alors que les RSV présentaient une dépense énergétique et un métabolisme de repos plus élevés que les deux autres groupes indépendamment de la saison. Pour finir, en dépit de variations saisonnières observées chez le microcèbe pour les taux d'IGF-1 et de testostérone, aucun des régimes alimentaires n'a induit de modifications de ces paramètres après un an de traitement. En conclusion, les régimes ont produit des modifications importantes de la balance énergétique des animaux après un an de traitement. Dans l'ensemble les microcèbes se sont bien acclimatés à leur traitement comme le montre la conservation des rythmes saisonniers observés normalement chez cette espèce et leur balance énergétique, restée stable. Ces résultats démontrent une plasticité importante des microcèbes soumis à des contraintes énergétiques ainsi que la mise en place rapide ou tardive de réponses adaptatives.

2) Evolution des performances cognitives et motrices à court et moyen terme

Les fonctions cognitives et les capacités motrices sont évaluées tous les ans pour tous les animaux du projet. Un premier bilan a été effectué après deux ans de traitements (Dal-Pan et al., 2011, **Article 3**, **Annexe A**). Les RC et les RES ont présenté des performances cognitives supérieures à celles des CTL lors du test de l'alternance spontanée (mémoire de travail). Dans le test de la plateforme circulaire (mémoire spatiale de référence) les RES ont fait moins d'erreurs que les CTL. Cependant aucun effet des traitements n'a été révélé dans le test de préférence conditionnée de place (mémoire associative émotionnelle). L'anxiété,

évaluée grâce au test du champ ouvert (Openfield) et au travers de mesures du taux de cortisol urinaire, ne présentait pas de différence entre les trois groupes.

OBJECTIFS ET ATTENTES

OBJECTIFS ET ATTENTES

Bien que les recherches dans le domaine du vieillissement se multiplient pour répondre notamment aux questions proximales relatives au vieillissement, il semble plus difficile de visualiser, dans leur ensemble, les mécanismes sous-jacents aux déclins physiologique, psychologique et comportemental qui se manifestent avec l'âge.

Ainsi, de nombreuses études rapportent les effets bénéfiques de certains protocoles anti-âges sur des paramètres « isolés » souvent physiologiques, qui minimisent les informations qui pourraient découler si ces protocoles étaient menés sur l'organisme dans son ensemble, c'est-à-dire sur les interactions qui existent entre les systèmes et les fonctions de l'organisme. De même, la validation de tels protocoles chez les modèles expérimentaux du vieillissement est restreinte et l'application ou la translation des techniques sont parfois impossibles à instaurer chez l'Homme. La nutrition joue un rôle critique dans la prévention et dans l'apparition de pathologies liées à l'âge, et ce particulièrement chez les individus vieillissants qui sont de plus en plus nombreux dans nos sociétés développées. Ainsi depuis une trentaine d'années, la majorité des études porte sur la mise en place d'interventions nutritionnelles et l'une d'entre elles est la restriction calorique. Malgré une étude récente montrant un retard d'apparition des pathologies liées à l'âge chez de grands singes, la restriction n'a encore jamais véritablement fait ses preuves chez les primates. Par ailleurs les effets d'un tel protocole ne sont pas universels puisqu'il s'est avéré chez certaines espèces (drosophiles, nématodes et certaines lignées expérimentales de souris) que la restriction calorique accélère la survenue de la mort ou n'a aucun impact. Bien que les réponses comportementales et physiologiques (notamment les mécanismes cellulaires activés) chez l'humain aient de fortes similitudes avec d'autres espèces (essentiellement rongeurs et primates non humains), certains aspects des réponses sont différents et révèlent parfois des limites d'utilisation et d'application des modèles animaux. Une question clé est donc de savoir si les caractéristiques les plus importantes sont celles qui sont communes ou celles qui diffèrent selon les espèces. À l'heure actuelle, la réponse à cette question demeure incertaine. Tous les efforts se portent aujourd'hui sur le développement de mimétiques potentiels des effets bénéfiques de la restriction calorique, tel que le resvératrol.

Chez l'Homme, quelques données sont disponibles concernant l'efficacité du resvératrol comme traitement préventif ou curatif contre certaines maladies chroniques du

métabolisme, dont le diabète de type II et l'obésité. Ces essais cliniques sont en effet prometteurs quant à l'utilisation du resvératrol pour améliorer la santé générale et prévenir des pathologies chroniques liées à l'âge. Toutefois, des recherches plus approfondies sont nécessaires et justifiées pour compléter nos savoirs notamment concernant les relations qui existent entre dose administrée et biodisponibilité dans l'organisme et plus précisément dans les organes cibles. Nous n'avons aucun recul sur les mécanismes pléiotropiques du resvératrol chez l'Homme et encore moins d'évidence concernant une supplémentation alimentaire ou orale à long terme sur le statut de santé général chez des espèces à durée de vie longue incluant l'Homme. Au vue de ces lacunes, il paraît indispensable de réaliser des études sur des modèles animaux présentant d'une part une durée de vie relativement importante et d'autre part de fortes similitudes avec l'Homme. Ce type d'étude, en traitement chronique, mettrait en évidence les effets du resvératrol aux différents stades de vie et surtout au cours du vieillissement, et enfin permettrait de valider cette molécule comme mimétique des effets positifs de la restriction calorique, offrant des perspectives certaines pour une application définitive chez l'Homme.

Dans ce contexte, l'ensemble des recherches réalisées au cours de mes travaux de doctorat vise à répondre aux questions suivantes sur l'impact d'une restriction calorique modérée et/ou d'une supplémentation en resvératrol débutées à l'âge adulte chez un primate non-humain :

- Induisent-elles un retard d'apparition des perturbations métaboliques liées à l'âge à moyen terme ?

- Agissent-elles à long terme sur les sorties comportementales, les capacités mnésiques et motrices du microcèbe ?

- Modifient-elles les bio-marqueurs du vieillissement ?

- Ont-elles un effet bénéfique sur la longévité de ce primate ?

Les résultats des travaux ayant permis de répondre à ces différentes questions sont présentés sous forme de publications scientifiques (acceptées, soumises ou en préparation) dans les trois chapitres suivants :

Chapitre I. Impact d'une restriction calorique ou d'un apport en resvératrol sur les perturbations métaboliques associées à l'âge

Impact de la restriction calorique ou d'une supplémentation alimentaire en resvératrol sur les marqueurs associés à des pathologies du métabolisme liées à l'âge : la résistance à l'insuline, les dommages du matériel génétique engendrés par le stress oxydant, et la dégradation des fonctions hépatiques chez un primate malgache.

Chapitre II. Impact des protocoles anti-âge sur le vieillissement cérébral et le comportement

Effets à long terme de la restriction calorique et du resvératrol sur les traits comportementaux spontanés (performances motrices et musculaires, anxiété, exploration et agressivité), sur les capacités mnésiques et leur relation avec l'atrophie cérébrale chez un modèle primate non humain.

Chapitre III. Stratégies anti-vieillissement : bio-marqueurs et longévité

Approche générale des effets d'une restriction calorique et d'une supplémentation en resvératrol, menées pendant 4 ans, sur les marqueurs physiologiques chez un primate non-humain et mise en évidence de l'évolution de ces marqueurs physiologiques au cours de l'âge.

Impact d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur la survie et la longévité chez un primate non humain et analyses a posteriori des marqueurs prédictifs de la longévité chez un primate non-humain, le microcèbe.

En résumé, ces recherches ont été conduites selon deux hypothèses :

- la première étant que la durée de vie d'un organisme peut être prolongée en « ralentissant » le vieillissement à partir de l'âge adulte. La restriction calorique et la supplémentation en resvératrol instaurées à l'âge adulte chez un primate non humain pourraient donc retarder l'apparition de pathologies du métabolisme liées à

l'âge, de même que le déclin général des fonctions de l'organisme constaté avec l'âge;

- la deuxième étant que la durée de vie peut être prolongée lorsque la « tolérance » au vieillissement est accrue, c'est-à-dire lorsque les capacités à survivre lors de complications survenant avec l'âge sont améliorées ou plus performantes. Nous avons donc comparé l'évolution des différents marqueurs physiologiques et comportementaux des animaux soit soumis à une restriction calorique, soit soumis à une supplémentation en resvératrol pour mettre en évidence les « taux de vieillissement » et visualiser si des réponses adaptatives aux traitements (réponses « promotrices » d'une résistance au vieillissement) se sont mises en place.

En conclusion, les effets de ces deux traitements à moyen et long terme sur les marqueurs physiologiques et comportementaux et sur la survie ont été comparés et les potentiels effets mimétiques du resvératrol par rapport à ceux de la restriction calorique ont été discutés. Les données engendrées par cette étude, organisées dans une base de données, pourront servir à l'avenir, au développement de stratégies permettant de limiter les effets néfastes du vieillissement chez l'Homme afin de lui permettre de vivre en meilleure santé et plus longtemps.

Chapitres

CHAPITRE 1

Impact d'une restriction calorique ou d'un apport en resvératrol sur les perturbations métaboliques associées à l'âge

Objectifs

Etude 1 : Impact de la restriction calorique ou d'une supplémentation alimentaire en resvératrol sur les marqueurs de la sensibilité à l'insuline chez le microcèbe

Etude 2 : Evaluation des dommages du matériel génétique chez un primate non-humain : impact d'une restriction calorique ou du resvératrol sur les marqueurs urinaires du stress oxydant cellulaire chez le microcèbe

Etude 3 : Fonctions hépatiques et protocoles anti-âge : effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol chez le microcèbe

Conclusion



Objectifs – Chapitre I

Ce premier chapitre a pour objectifs d'évaluer, par le biais de marqueurs biologiques, le déclin des fonctions de l'organisme qui survient au cours de l'âge et qui peut être accompagné d'altérations ou de pathologies chez le microcèbe. Le vieillissement induit une diminution globale de l'aptitude des organismes à des degrés plus ou moins avancés, et étant donné que le processus du vieillissement est lent et progressif, il offre *a priori* la possibilité d'intervenir et d'améliorer les capacités fonctionnelles générales d'un individu. Ainsi une intervention débutée « tôt » dans la vie d'un individu est susceptible de ralentir les pertes de fonctions et l'apparition de pathologies liées à l'âge. Le développement de protocoles alimentaires modulant le vieillissement et ses effets semble être prometteur dans ce contexte scientifique. Nous avons donc comparé l'impact d'une restriction calorique modérée ou d'une supplémentation en resvératrol à moyen (1-2 ans de traitement) et long terme (3-4 ans de traitement) sur les perturbations qui peuvent survenir au cours de l'âge chez un primate non-humain. Afin d'évaluer le potentiel, les bénéfices et les limites de telles interventions anti-âge, une comparaison avec un groupe d'animaux contrôles a été réalisée. Les études 1 et 2 portent sur la sensibilité à l'insuline et le stress oxydant cellulaire, deux marqueurs du vieillissement bien étudiés et documentés chez les mammifères. Ces deux études sont complétées par une troisième, visant à la validation des marqueurs du métabolisme hépatique dans un contexte de dépistage d'altérations métaboliques potentielles et/ou la caractérisation de l'état de santé des microcèbes en captivité et soumis à l'un ou l'autre des traitements : la restriction calorique ou la supplémentation alimentaire en resvératrol.

Etude 1 : Impact de la restriction calorique ou d'une supplémentation alimentaire en resvératrol sur les marqueurs de la sensibilité à l'insuline chez le microcèbe

Introduction

La sensibilité à l'insuline est un marqueur pertinent pour évaluer les effets bénéfiques d'interventions nutritionnelles sur l'état de santé d'un organisme. La RC est capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline chez les rongeurs. Des observations faites chez le macaque rhésus, montrent que plus le taux d'insuline circulante est élevé et plus la longévité est réduite. De même, des primates soumis à une restriction calorique présentent moins de risque de diabète de type II et de maladies cardio-vasculaires par rapport aux animaux contrôles. Chez l'Homme, des observations après 6 mois de RC sont cohérentes avec celles établies chez les petits mammifères et le macaque, révélant des taux d'insuline plus bas, un métabolisme basal et une température corporelle abaissés. Ces données fournissent la preuve qu'une RC peut avoir des effets bénéfiques dans la prévention contre le diabète ou la résistance à l'insuline chez l'Homme.

Le resvératrol (RSV) permet de réduire de nombreuses conséquences induites par une alimentation riche en calories chez la souris, en augmentant leur survie et en les protégeant contre l'insulino-résistance. Le RSV inhibe également la sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques chez des rats normaux et abaisse l'insuline dans le sang de rongeurs non-obèses. Le RSV peut donc jouer un rôle important dans les processus de régulation du métabolisme énergétique en ciblant la voie de l'insuline. Cependant, malgré de nombreuses études chez des espèces à durée de vie courte, les effets de tels traitements sur l'apparition de perturbations métaboliques chez des espèces longévives comme les primates non-humains sont très rares. Ainsi, l'objectif de cette étude était de déterminer chez le microcèbe si ces traitements chroniques empêchent la diminution liée à l'âge de la sensibilité à l'insuline responsable de complications métaboliques chez les mammifères et d'une durée de vie raccourcie.

Matériels et méthodes

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser le test oral de tolérance au glucose (HGPO) pour mesurer la sensibilité à l'insuline. L'HGPO reflète l'efficacité avec laquelle l'organisme dispose du glucose après une charge orale glucosée saturée. L'HGPO fournit des informations sur la tolérance au glucose et, si l'insulinémie à jeun est mesurée, il permet l'évaluation d'un marqueur de sensibilité à l'insuline, le modèle d'homéostasie insulinémique (index HOMA-IR). Le microcèbe ne permet pas d'obtenir de grands volumes de sang lors des prélèvements (maximum 200µL), ainsi l'HGPO était la méthode la plus appropriée pour évaluer la tolérance au glucose et la résistance à l'insuline chez ce modèle primate. Les marqueurs de la sensibilité à l'insuline ont été évalués grâce à l'HGPO et l'index HOMA-IR dans deux groupes différents de microcèbes uniquement durant la période de jours longs: un groupe après 21 mois de traitement et un autre groupe après 33 mois de traitement. Le taux de métabolisme basal (au repos ; RMR) a également été évalué, car il est un élément pertinent de l'estimation de la dépense énergétique quotidienne. Une diminution du RMR a également été associée au syndrome métabolique chez l'Homme. Nous avons donc évalué les relations entre ce paramètre et les marqueurs de sensibilité à l'insuline précédemment énoncés.

Résultats

Après 21 mois de traitement, seule la RC a induit un abaissement de la glycémie au cours du challenge glucosé. Cependant après 33 mois de traitement, les effets des traitements ont été plus marqués, avec tout d'abord une réduction des taux de glucose sanguins au cours de la cinétique glycémique qui a suivi l'hyperglycémie provoquée orale. En effet, la RC et le RSV ont induit une diminution de la glycémie au cours du challenge glucosé sans perturber les taux d'insuline et de glucose à jeun. Par ailleurs, les deux traitements ont significativement amélioré la sensibilité à l'insuline mais a des amplitudes différentes, alors que l'HOMA-IR a été réduit de 81% chez les animaux restreints par rapport aux animaux du groupe contrôle, le RSV a permis une réduction de 53%. De même, chez les animaux CTL, nous avons pu mettre en évidence une relation positive entre l'HOMA-IR et la masse corporelle ainsi qu'une relation négative entre l'HOMA-IR et les taux de métabolisme basal, relation absente chez les deux groupes d'animaux traités.

Discussion

La restriction calorique et le resvératrol ont eu des effets similaires mais avec des amplitudes différentes qui pourraient s'expliquer par des réponses adaptatives métaboliques (ex : voie de régulation) différentes suivant les traitements.

L'une des voies similaires possible à ces deux traitements implique un groupe de protéines, les Sirtuines, et plus particulièrement Sirt1, que nous prévoyons d'évaluer dans le cadre de ces traitements chroniques. L'effet bénéfique du RSV semble être induit par des protéines également impliquées dans les voies mises en place lors d'une RC, comme l'AMP kinase et PGC-1α, mais les mécanismes précis sont encore mal connus. Cependant, l'abaissement de l'apport énergétique produit par la RC ou par des molécules mimétiques des effets de la RC, comme le RSV, semble prévenir l'organisme contre les maladies et les dysfonctionnements métaboliques, par des mécanismes hormétiques améliorant la résistance aux différents facteurs de stress.

Par conséquent, la possibilité d'effectuer un suivi longitudinal de nombreux paramètres physiologiques dans des conditions contrôlées offre une base solide dans l'appréhension des mécanismes communs ou différents aux deux traitements. En raison des recommandations vis-à-vis de ces protocoles pour la prévention et les traitements de maladies chroniques telles que le diabète de type II, cette étude sur la sensibilité à l'insuline est d'un grand intérêt.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Effects of Chronic Calorie Restriction or Dietary Resveratrol Supplementation on Insulin Sensitivity Markers in a Primate, *Microcebus murinus*

Julia Marchal[1], Stéphane Blanc[2], Jacques Epelbaum[3], Fabienne Aujard[1]*, Fabien Pifferi[1]

1 Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France, **2** Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département d'Ecologie, Physiologie, Ethologie UMR 7178 CNRS Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, **3** Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

Abstract

The prevalence of diabetes and hyperinsulinemia increases with age, inducing metabolic failure and limiting lifespan. Calorie restriction (CR) without malnutrition delays the aging process, but its long-term application to humans seems difficult. Resveratrol (RSV), a dietary polyphenol, appears to be a promising CR mimetic that can be easily administered in humans. In this work, we hypothesized that both CR and RSV impact insulin sensitivity in a non-human primate compared to standard-fed control (CTL) animals. Four- to five-year-old male grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) were assigned to three dietary groups: a CTL group, a CR group receiving 30% fewer calories than the CTL and a RSV group receiving the CTL diet supplemented with RSV (200 $mg \cdot day^{-1} \cdot kg^{-1}$). Insulin sensitivity and glycemia were assessed using an oral glucose tolerance test (OGTT) and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR index) evaluation after 21 or 33 months of chronic treatment. Resting metabolic rate was also measured to assess the potential relationships between this energy expenditure parameter and insulin sensitivity markers. No differences were found after a 21-month period of treatment, except for lower glucose levels 30 min after glucose loading in CR animals. After 33 months, CR and RSV decreased glycemia after the oral glucose loading without decreasing fasting blood insulin. A general effect of treatment was observed on the HOMA-IR index, with an 81% reduction in CR animals and 53% in RSV animals after 33 months of treatment compared to CTL. Chronic CR and dietary supplementation with RSV affected insulin sensitivity by improving the glucose tolerance of animals without disturbing their baseline insulin secretion. These results suggest that both CR and RSV have beneficial effects on metabolic alterations, although these effects are different in amplitude between the two anti-aging treatments and potentially rely on different metabolic changes.

Citation: Marchal J, Blanc S, Epelbaum J, Aujard F, Pifferi F (2012) Effects of Chronic Calorie Restriction or Dietary Resveratrol Supplementation on Insulin Sensitivity Markers in a Primate, *Microcebus murinus*. PLoS ONE 7(3): e34289. doi:10.1371/journal.pone.0034289

Editor: Nick Ashton, The University of Manchester, United Kingdom

Received December 14, 2011; **Accepted** February 27, 2012; **Published** March 30, 2012

Copyright: © 2012 Marchal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was conducted with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aujard@mnhn.fr

Introduction

Calorie restriction (CR) is the only non-genetic intervention that extends lifespan and delays the onset or reduces the emergence of age-associated diseases in short-lived species, such as invertebrates and rodents [1]. Ample evidence demonstrates the impact of dietary CR on lifespan extension and on metabolic diseases [2,3] but the mechanisms by which CR exerts its anti-aging effects are not yet clear. Although the precise molecular mechanisms for this action remain controversial, some studies support the central importance of drastic modifications in energy metabolism [4]. Indeed, the mechanisms triggered by CR play a key role in the response to reduced energy availability, resulting in the induction of an altered metabolic state that is thought to promote longevity [5]. Insulin sensitivity is a relevant marker in evaluating the long-term health benefits of nutritional interventions, such as CR, as it increases systemic insulin sensitivity in rodents [6,7,8]. CR also reduces glycemia and the tissue accumulation of advanced glycation end products in rats [9]. In agreement with data from rodents, consistent metabolic changes are observed secondary to a CR treatment in the non-human primate *Macaca mulatta*, suggesting that the group with greater circulating insulin exhibits a faster age-dependent decline in survival rate [10,11,12]. In one study, CR monkeys (>18 years old) exhibit less diabetes and cardiovascular disease risks compared to control animals ([13]). Moreover, type II diabetes was not diagnosed in CR primates, in contrast to CTL groups, in which almost 50% presented diabetic or pre-diabetic states [14]. In human subjects, observations after 6 months of CR are consistent with those in monkeys and rodents in terms of lower insulin levels, in addition to basal metabolic rate and body temperature [15]. These data provide evidence that CR may have beneficial effects in protecting against diabetes or insulin resistance.

Nevertheless, due to social, economic and medical reasons, compliance to a CR paradigm seems impractical in humans, especially in the long term. Thus, recent research has developed CR mimetics [16,17]. Among these, resveratrol (3,5,40-trihydroxy-trans-stilbene, RSV) has received special attention, as this polyphenol reduces many consequences of a high-calorie diet in mice and increases their survival by protecting them against

insulin resistance [18]. Moreover, RSV inhibits insulin secretion of the pancreatic islets in normal rats [19], and similarly to CR, it lowers blood insulin in rodents [18,20]. Thus, RSV may play an important role in energy regulation processes by targeting the insulin pathway. However, despite the numerous studies in short-lived species (flies, nematodes, mice and rats) on CR and aging, only a few have concerned long-lived species, and the effects of CR and those of a CR mimetic have not been compared in primates.

Thus, the objective of this study was to determine whether long-term RSV treatment prevents the age-related decrease in insulin sensitivity similarly to long-term CR in a primate species. This study occurred within the RESTRIKAL program [21], started in 2008, which aimed to investigate the long-term effects of CR or dietary RSV supplementation on physiological and behavioral parameters throughout the aging process of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), which is a unique animal model to investigate aging (see [22] for review). Indeed longitudinal studies in this species can be performed on a longer range than those conducted in rodents, as the mouse lemur presents a median survival time of 5.7 years for males and an average lifespan of 11.0±0.2 years, based on data from the Brunoy breeding colony [22], living up to two-three times longer than mammals of equivalent body mass [23].

In this study, we chose to use the oral glucose tolerance test (OGTT) to measure insulin sensitivity. Even though the glucose clamp technique [24] is widely accepted as the standard reference for directly determining metabolic insulin sensitivity in humans, this method requires anesthesia, which is known to influence glycemia even in a fasting state. Additionally, OGTT reflects the efficiency with which the organism disposes of glucose after an oral glucose load. Thus, it provides useful information about glucose tolerance, and the OGTT data allow for the assessment of one of the surrogate validated indices of insulin sensitivity, the homeostasis model assessment (HOMA-IR index). In addition, the grey mouse lemur does not allow for large blood volume sampling because it has a low circulating blood volume. Thus, OGTT was the most suitable method to evaluate the glucose tolerance and insulin resistance of this primate model. Markers of insulin sensitivity were assessed through OGTT and the HOMA-IR index in two different groups of mouse lemurs: one group after 21 months of chronic CR or RSV treatment and another group after 33 months of chronic CR or RSV treatment. The resting metabolic rate (RMR) was also assessed, as it is a relevant component of daily energy expenditure estimation and a widely used predictive factor of body mass gain in human studies [25]. RMR has also been associated with metabolic syndrome in humans [26]. We were therefore interested in evaluating the relationships between this parameter and markers of insulin sensitivity.

Materials and Methods

Ethics statement

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). The research was conducted under the authorization number 91–305 from the "Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Essonne" and the Internal Review Board of the UMR 7179. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research", special attention was paid to the welfare of the animals during this work to minimize nociception [27].

Animals and husbandry

All grey mouse lemurs studied were males that were born in the laboratory breeding colony of Brunoy (UMR 7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773). These animals were part of the RESTRIKAL study [21]. The general conditions of captivity were constant. Animals were exposed to ambient room temperature (24–26°C) and relative humidity (55%). In captivity, seasonal variations of physiological and behavioral functions were entrained by alternating between 6 months of a long-day (LD) photoperiod (14:10 light:dark) and 6 months of a short-day photoperiod (SD) (10:14 light:dark), under artificial light (white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Animals were studied during the LD period, and measurements were made at least 2 months after the onset of the season, when their physiological status was stabilized. To minimize social influences, animals were housed individually in cages (50×40×30 cm), visually separated from each other. All tests were performed during the last 4 hours of the light phase, when animals begin their daily activity. The body mass of each animal was measured every week and the day before measurements to avoid stress from frequent handling. For ethical reasons, special attention was paid to the body mass evolution of the CR group because of their leanness during the LD period.

Dietary interventions

Animals were fed fresh fruits and a daily mixture made up of ginger bread, cereals, milk and eggs [21]. Water was given *ad libitum*. Thirty-four animals were used in this study, randomly distributed into three different dietary groups at the age of 38±1 months: an *ad libitum* CTL group, a group of animals submitted to CR that were fed the same diet but received 30% less than CTL and a third group of animals supplemented with RSV that were fed the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of RSV per kilogram body mass per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 5.2 mg/kg.d−1 of Baur et al. [28] and the 400 mg/kg.d−1 of Lagouge et al. [29]. To measure the exact quantity of food ingested by the animals, daily leftovers were measured and corrected for water evaporation. In this cross-sectional study, measurements were performed on two cohorts of animals: one cohort exposed to 21 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 6, age: 59.9±1.2 months) and one cohort exposed to 33 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 8, age: 71.8±1.1 months).

Evaluation of fasting glycemia and glycemic response to OGTT

Glucose metabolism was assessed during the LD period, three months after the onset of the LD season. On the eve of the oral glucose tolerance test (OGTT), the food portion (fresh fruit and mixture) was removed from the cage. Fasting glycemia was measured using a non-invasive method with a hand-held blood glucose meter (Accu-Chek Active®, Hoffmann-La Roche, Switzerland) at the end of the resting phase of the animal but before food became available. OGTT was performed using a 1.75 g glucose.kg^{-1} body mass glucose challenge, consistent with previous research in rodents [30]. Animals received the oral glucose load between 1100 and 1115 am in the form of anhydrous glucose (Glucose Rectapur®, BDH Prolabo, UK) diluted in 0.6 ml of water, administered *per os* over 1 min. The hand-held glucometer required only 5 µl of total blood for each test stick, which were collected via the saphenous vein, in duplicate. Time

points were determined on the basis of the results of a pilot study (Figure S1) in a sub-cohort of animals, with a lower sample size (CTL n = 3; CR n = 2; RSV n = 3). It showed no peak at 15 min after the oral load of glucose in the same experimental conditions as the final study. On the basis of the pilot results and since it is difficult to collect a high number and volume of blood samples in the grey mouse lemurs, we decided to focus on the most informative time points. Thus, blood was sampled at 30, 60 and 120 minutes after the glucose challenge. The first measurement corresponded to fasting glycemia.

Plasma insulin assays

Fasting blood sampling for insulin assays was performed before the OGTT and at the same time as the fasting blood sampling for baseline glycemia. Blood samples were taken via the saphenous vein, without anesthesia, at the end of the resting phase but before food became available. Blood samples (100 to 150 µL) were collected in tubes containing EDTA and represented less than 1% of the blood volume of each animal. However, we failed to take a blood sample from two CR animals; thus, only 8 CR animals were available for insulin assessment. Blood samples were centrifuged at 2000 *g* at 4°C for 30 min. Before storage of plasma at −80°C, the samples underwent a second centrifugation at 2000 *g* at 4°C for 10 min. Plasma insulin was measured in simplicate due to the minimal plasma volume collected using the Human Insulin assay method (Elisa technology, Cat. # EZHI-14K).

Insulin resistance index

Basal insulin resistance was estimated by HOMA-IR, which was calculated using fasting glucose and fasting insulin as an assessment of basal insulin resistance [31]. Fasting insulin and glucose collected at the time of the OGTT were used in the HOMA-IR formula as follows: HOMA-IR = Fasting insulin (µIU/mL) * Fasting glucose (mmol/L)/22.5 [32].

Resting metabolic rate

Oxygen consumption was measured with a closed-circuit respirometer one month after the OGTT and the fasting insulin level assays (i.e., after 22 or 34 months of treatment). For this nocturnal species, RMR measurements were performed during their daily resting period, 4–6 h after the beginning of the light period, to avoid torpor metabolism. Animals were trained to nest in the respiratory chamber, which consisted of 2.5-L opaque chamber with a woven floor to absorb any urine. During the experiment, the respiratory chamber was placed in a cabinet at a controlled ambient temperature of 25.0±0.5°C, a value within the thermo-neutral zone defined for the mouse lemur [33]. After a 20 min habituation phase under constant airflow ventilation (2 $L \cdot min^{-1}$) drawn through the respirometry chamber from bottom to top, the chamber was closed for 40 min. The VO_2 consumed by the animal was calculated from the initial and final concentrations of O_2 in the chamber, which were measured on dried gas using a Servomex 570 A paramagnetic gas analyzer (accuracy 0.01% O_2). The analyzer was routinely calibrated with N_2 and atmospheric air. O_2 consumption was expressed as mL $O_2 \cdot h^{-1}$ and was adjusted for the body mass of the animal [34].

Data analysis and statistics

The Shapiro-Wilk goodness-of-fit test was applied to determine whether the sample data were likely to derive from a normally distributed population. All data were analyzed to estimate and test the individual and interactive effects of treatments (diets) and treatment duration using two-way ANOVA. Bonferroni post-hoc tests were used to determine the significance of differences between each pair of the three groups. Two-way ANOVA for repeated measures with consecutive multiple comparison tests was used to compare the time courses of glucose during OGTT among the CTL, CR and RSV animals. Simple linear regressions were also used to determine the significance levels of correlations among variables. All analyses were performed with SYSTAT version 12 (SYSTAT Software, Inc., San Jose, California). A level of $p<0.05$ was set for significance, and all values are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM).

Results

Effects of age and treatments on body mass and OGTT-related parameters

As shown in Figure 1, body mass varied significantly among the three groups, as we observed an important effect of treatment ($dF = 2/28$, $F = 8.562$, $p = 0.001$), while no general effect of age occurred ($dF = 1/28$, $F = 0.719$, $p = 0.404$). However, body mass was not different among the three groups after 21 months of treatment; only the CR animals presented significantly lower body mass after 33 months of treatment compared to the CTL animals ($p = 0.003$).

The OGTT results are presented in Figure 2, for each treatment and by age group. OGTT measurements significantly varied according to the treatment ($dF = 2/28$, $F = 6.926$, $p = 0.004$), regardless of the duration of the treatment ($dF = 1/28$, $F = 2.418$, $p = 0.131$). Additionally, OGTT values varied within the time course ($dF = 3/84$, $F = 39.68$, $p<0.001$) according to the treatment ($6/84$, $F = 5.74$, $p<0.001$) and treatment duration ($dF = 3/84$, $F = 3.61$, $p = 0.017$). After 21 months of treatment, the CR and RSV animals presented slight decreases in glucose compared to the CTL animals, but neither was significant. However, after 33 months of treatment, post-hoc tests revealed that the CR animals presented lower plasma glucose levels at 30 and 60 minutes after the beginning of the OGTT ($p = 0.012$ and $p = 0.041$, respectively). The RSV animals presented lower glucose levels at 30 minutes after glucose loading ($p = 0.043$), while no significant difference was found 60 minutes after the glucose loading ($p = 0.074$). Additionally, baseline glucose levels were not different among the three groups at 21 or 33 months nor were glucose levels 120 minutes after the glucose loading.

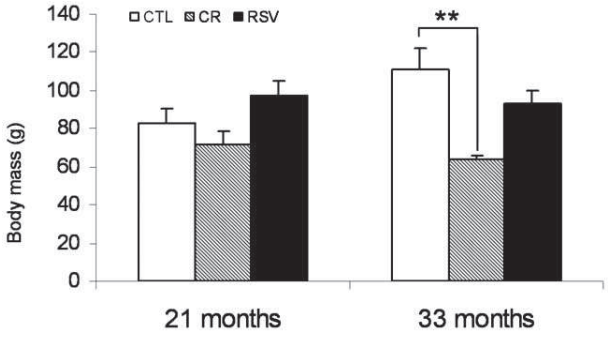


Figure 1. Body mass at oral glucose tolerance test in control (CTL), calorie restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) animals after 21 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 6) and after 33 months of treatment (n CTL = 5, n CR = 5, n RSV = 8). Data are expressed as means±SEM. Statistical significance (**) $p<0.01$ when comparing CTL and CR animals.
doi:10.1371/journal.pone.0034289.g001

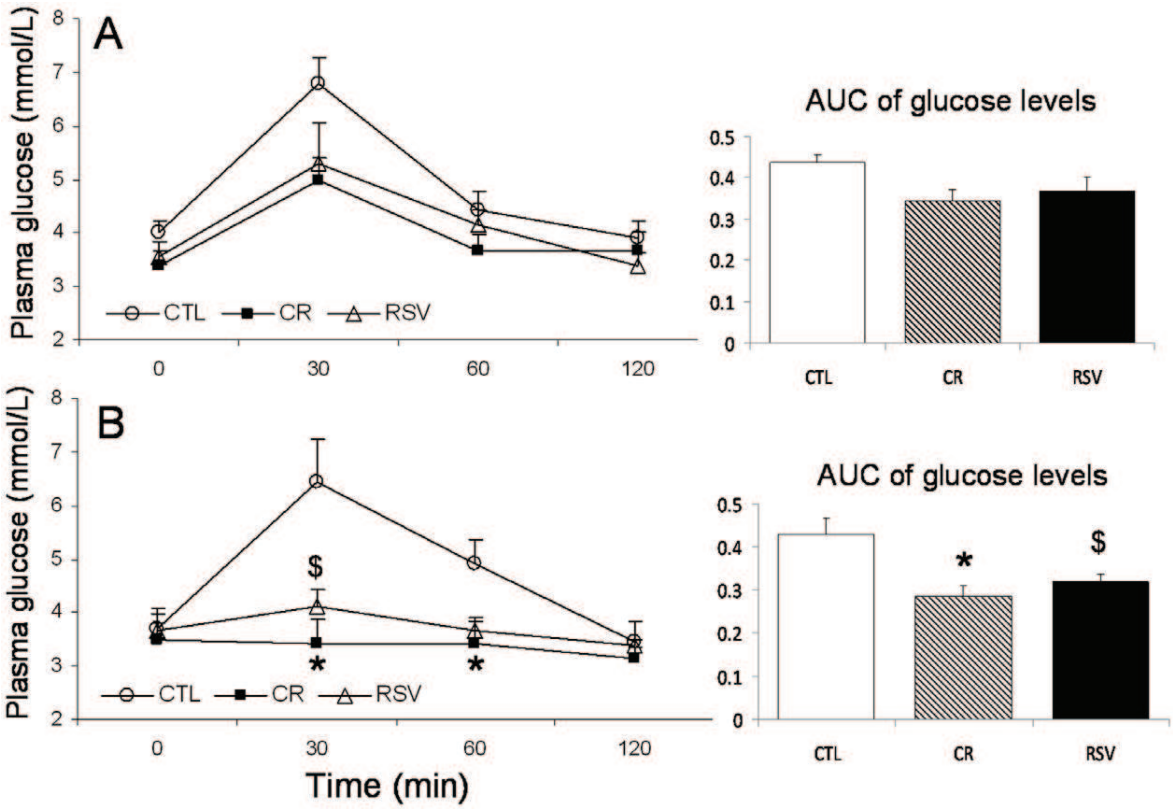


Figure 2. Plasma glucose concentrations and area under curves (AUC) during oral glucose tolerance test in control (CTL), calorie restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) animals. A: after 21 months of treatment and B: after 33 months of treatment. Data are expressed as means±SEM. Statistical significance (*) $p<0.05$ when comparing CTL and CR animals, ($) $p<0.05$ when comparing CTL and RSV animals.
doi:10.1371/journal.pone.0034289.g002

Areas under the curve (AUCs) varied significantly with treatment, as we found a general effect ($dF = 2/28$, $F = 9.073$, $p = 0.001$) regardless of the duration of the treatment ($dF = 1/28$, $F = 2.979$, $p = 0.095$). Despite the lack of a significant difference in AUC between either of the treated groups and the CTL group after 21 months of treatment (CR: $p = 0.263$ and RSV: $p = 0.543$), the AUC of the CR animals was lower after 33 months ($p = 0.017$), as was the AUC of the RSV animals ($p = 0.048$) compared to the CTL group.

Effects of age and treatments on fasting plasma insulin, HOMA-IR and RMR

A nearly significant effect of treatment on fasting insulin was revealed ($dF = 2/26$, $F = 3.141$, $p = 0.06$), while no significant effect of age was found ($dF = 1/26$, $F = 1.722$, $p = 0.201$), nor was a crossed effect found ($dF = 2/26$, $F = 1.856$, $p = 0.176$) (Table 1).

HOMA-IR varied according to the treatment ($dF = 2/26$, $F = 3.368$, $p = 0.048$), regardless of the duration of the treatment ($dF = 1/26$, $F = 1.555$, $p = 0.224$). The crossed effect between treatment and age was not significant ($dF = 2/26$, $F = 1.167$, $p = 0.327$). HOMA-IR in the CR animals was lower than in CTL by 70% after 21 months of treatment and by 81% after 33 months of treatment. In the RSV animals, HOMA-IR was similar to the HOMA-IR of CTL mouse lemurs after 21 months of treatment but was attenuated by 53% after 33 months of treatment compared to the CTL animals (Table 1).

RMR did not vary with treatment across the two ages ($dF = 2/23$, $F = 2.522$, $p = 0.111$). Similarly, no effect of age was found ($dF = 1/23$, $F = 0.184$, $p = 0.678$), nor was a crossed effect found ($dF = 2/23$, $F = 1.89$, $p = 0.185$) (Table 1).

Relationships between insulin sensitivity parameters and metabolic parameters

We combined the data from both cohorts for the simple linear regressions (Table 2). Fasting insulin and body mass were highly related in the CTL animals ($r = 0.89$, $p<0.001$). However, this relation was not observed for the CR ($r = 0.122$, $p = 0.773$) or RSV animals ($r = 0.122$, $p = 0.679$). Similarly, HOMA-IR and body mass were related in the CTL animals ($r = 0.943$, $p<0.001$) but not in the CR ($r = 0.283$, $p = 0.496$) or RSV animals ($r = 0.077$, $p = 0.794$). In addition, the CTL animals exhibited a strong positive relation between HOMA-IR and RMR ($r = 0.847$, $p = 0.033$), which was not the case for the CR ($r = 0.346$, $p = 0.401$) or RSV animals ($r = 0.077$, $p = 0.802$).

Discussion

This study provides insight into whether the effects of CR or RSV on insulin and glucose functions can occur in the grey mouse lemur at early–middle age. Our results indicate that beneficial effects of CR and RSV appeared after 33 months by decreasing glycemia after a glucose challenge. Additionally, chronic CR and RSV treatments led to enhanced insulin sensitivity, as indicated by the HOMA-IR index values, compared to the CTL group, whatever the duration of treatment.

Table 1. Sample size, fasting plasma levels of insulin and HOMA-IR obtained during the OGTT after 21 months of treatment or after 33 months of treatment.

	21 months of treatment			33 months of treatment		
	CTL	CR	RSV	CTL	CR	RSV
Fasting insulin (μIU/mL)	31.35±13.40 n = 5	12.74±4.09 n = 4	38.04±15.80 n = 6	86.85±26.73 n = 5	14.47±2.89 n = 4	35.71±14.95 n = 8
HOMA-IR	5.72±2.44 n = 5	1.72±0.40 n = 4	5.96±2.25 n = 6	12.85±2.89 n = 5	2.46±0.69 n = 4	6.05±2.65 n = 8
Resting metabolic rate (mL O2/h/g$^{-0.67}$)	3.51±0.30 n = 2	3.45±0.15 n = 5	3.61±0.37 n = 6	2.74±0.32 n = 4	3.58±0.81 n = 5	4.75±0.33 n = 7

Data are expressed as means±SEM. Control (CTL), calorie restricted (CR), resveratrol (RSV).
doi:10.1371/journal.pone.0034289.t001

In humans, the decline of gluco-regulatory functions and insulin resistance occur in the great majority of elderly, with the states of glucose intolerance due in part to a decline in peripheral tissue sensitivity to insulin [35]. To maintain glucose homeostasis, the compensatory response to a decrease in insulin-stimulated glucose uptake is an increase in plasma insulin concentration, and several reports have documented a significant direct relationship between the magnitude of insulin resistance and the degree of associated hyper-insulinemia in non-diabetic individuals (see [36] for a review). Nevertheless, the capacity of insulin to stimulate glucose uptake can vary substantially among non-obese persons with no apparent disease [37]. During the OGTT, our results did not reveal an effect of age on the glycemia response to the glucose challenge, neither on fasting insulin nor on HOMA-IR. Nevertheless, it is important to note that the study was conducted on 5- to 6-year-old animals, corresponding to middle age in this species [22].

In CTL animals, both fasting insulin and HOMA-IR were strongly positively correlated with body mass. To exclude any cohort effect, we compared body weights of the two cohorts of animals after the same time of treatment and found no significant differences (data not shown). These findings confirm previous research in humans that showed a positive correlation among body mass index, plasma insulin and plasma glucose in both normal and obese populations [38]. Their study revealed that total body mass may be a good indicator of the need to screen for metabolic disorders, such as type II diabetes, in adult subjects. However, in most human studies that measured fasting insulin, the study samples were not representative of the normal population because they included a large proportion of overweight subjects [39,40]. Similarly, in the majority of rodent studies, the animals were overweight [41], genetically obese [42] or on a high-calorie diet [43,44], which induce both glucose and insulin metabolism disorders and disturbances of *in vivo* insulin action [45]. Therefore, the correlations identified in the CTL mouse lemurs in this study support the relationships among body mass gain, insulin resistance and the decline of gluco-regulatory functions, all of which may occur even in a normal population without nutritional modification. Moreover, the negative correlation between the HOMA-IR and RMR in the CTL animals supports the hypothesis that glucose metabolism disorders and pre-diabetic states might be characterized by a lower energy expenditure, which facilitates body mass gain. One four-year follow-up study in human subjects indicated that individuals with metabolic syndrome exhibited a significantly lower RMR adjusted for fat-free mass compared to the control group, indicating that a low rate of energy expenditure is a risk factor for body mass gain and obesity [25].

One of the main objectives of this work was to test whether CR may improve insulin sensitivity in the mouse lemur. We demonstrated that chronic CR started at the adult age improved markers of insulin sensitivity. After 33 months of treatment, CR induced a decrease in body mass when compared to CTL. Weight loss produces numerous benefits in altered metabolic states, including reduced glycemia, reduced fasting insulin and increased insulin sensitivity [46]. Nevertheless, when human subjects returned to a normal diet after a 24-h reduction in food energy, the blood glucose concentration increased, suggesting that the major underlying factor is the reduction in calorie intake rather than the body mass loss [47]. In mouse lemurs, CR reduced the glycemia response to a glucose challenge (OGTT) after 33 months of treatment, but some studies have revealed even faster CR effects. In over-fed rodents, a moderate CR for 48 h causes changes in the liver and skeletal muscle metabolism by lowering the glucose production rate [48]. Similarly, an acute but short-term CR without malnutrition has been effective in the care of type II diabetes by improving insulin-stimulated glucose uptake in humans [49]. However, the CR mouse lemurs in this study were not overweight or previously over-fed, suggesting that long-term CR has benefits in non-diabetic individuals by decreasing the glycemia threshold after the glucose challenge by inducing metabolic disturbances that only occur with long-term treatment.

We did not identify any correlations between the markers of insulin sensitivity and body mass or RMR in CR animals. In obese

Table 2. Table of simple linear regressions in CTL, CR and RSV animals.

Dependent variables	Independent variables	CTL group	CR group	RSV group
HOMA-IR	**Body mass (g)**	n = 10 r = 0.940 ***	n = 8 r = 0.122 NS	n = 14 r = 0.122 NS
Fasting insulin (μIU/mL)	**Body mass (g)**	n = 10 r = 0.943 ***	n = 8 r = 0.283 NS	n = 14 r = 0.077 NS
HOMA-IR	**RMR (mL O2/h/g-0.67)**	n = 6 r = 0.847 *	n = 8 r = 0.346 NS	n = 13 r = 0.077 NS

Sample size for each diet groups and Pearson correlation coefficient r are given for each regression, as dependent and independent variables. Statistical significance was considered when $p<0.05$ (*), $p<0.001$ (***), NS: non significance. Control (CTL), calorie restricted (CR), resveratrol (RSV).
doi:10.1371/journal.pone.0034289.t002

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

humans, a strong negative correlation exists between weight loss and insulin sensitivity that is statistically superior to the correlations between weight loss and fasting glucose, fasting insulin and HOMA-IR [50]. Similarly, insulin sensitivity can improve because of weight reduction in obese individuals on very low-calorie diets [51]. Here, in CR mouse lemurs, the absence of a relationship among the studied parameters indicates a non-dependence between the decrease of glucose level after the glucose challenge and the weight loss. This finding suggests that the enhancement of insulin sensitivity was not only due to weight loss but also to metabolic changes that occurred during the chronic CR. In addition, despite no variation with treatment in RMR, the lack of a relationship between this parameter and the estimation of insulin sensitivity indicates that modifications in glucose or hormonal metabolism were independent of metabolic status in CR animals. However, in future investigations, we should test the relationships between the variations in body mass over the duration of treatment and the glucose or insulin parameters, and the animals could be returned to a normal diet to assess whether the body mass loss or the reduction in energy expenditure is responsible for the improved insulin sensitivity.

The second aim of this study was to investigate whether the beneficial effects observed in CR animals would be replicated in RSV animals, as the most recent data from animal studies present a promising perspective of the potential use of RSV in preventing and treating metabolic disorders, such as diabetes and obesity [29]. Primarily, we did not observe any difference between the body masses of the RSV and CTL animals, in contrast to what we observed between the CR and CTL animals after 33 months of treatment. This finding agrees with previous results from the one-year report of the RESTRIKAL study [21]. Meanwhile, RSV was reported to reduce body mass gain in adult mouse lemurs after one month of treatment [52] or in rats fed a high-fat diet [53], but its effects are controversial because such results have not been replicated in other studies [54]. One reason for these discrepancies is certainly the short-term treatments that have been used, during which organisms presented decreased body mass that occurs because of an increase in total energy expenditure [21]. As shown by Dal-Pan et al., RSV produced an activation of metabolism without a loss in body mass, in contrast to CR animals, which exhibited a reduction in energy expenditure, particularly during the LD season, when the energy constraints are more important than in the short-day season. In this study, the body masses of the RSV mouse lemurs did not differ from the CTL mouse lemurs and did not correlate with plasma insulin or with HOMA-IR, in contrast to what we observed for the CTL animals. As shown in the CR animals, the enhancement of insulin sensitivity markers in the RSV-treated animals was not related to changes in body mass, even though, as opposed to the CR animals, they had the same amount of daily calorie intake as the CTL animals. Indeed, the RSV animals exhibited lower blood glucose levels during OGTT after 3 years of treatment. RSV and other wine polyphenols have been proposed to affect blood glycemia through the inhibition of glucose absorption in the intestine or of its uptake by peripheral tissues [55]. In addition, RSV decreases insulin secretion and delays the onset of insulin resistance, possibly by inhibiting ATP- and voltage-dependent channels in pancreatic beta-cells [56]. We did not observe lower fasting insulin levels in the RSV animals, despite a slight decreasing tendency compared to the CTL mouse lemurs. Similar findings have been shown in type 2 diabetic patients, in whom a positive effect on glycemia was clearly revealed after grape seed extract ingestion, but this did not result in statistically significant changes in blood insulin levels [55]. Data from the literature and the results of this study indicate that the capacity of RSV to induce changes in baseline blood insulin levels remains controversial. Our inconclusive findings could have been due to the dose given to the animals (200 $mg{\cdot}day^{-1}{\cdot}kg^{-1}$), as many publications reveal a dose-dependent activity of this molecule [20]. We can also suggest that RSV may act on glucose metabolism by decreasing the glycemia response during an OGTT, which may be due to a physiological insulin-secretory response to glucose. However, we only assessed the basal insulin level, and we cannot draw conclusions about the evolution of insulin release in response to the glucose challenge. However, Szkudelski demonstrated that RSV decreases the insulin secretion of rat pancreatic islets when incubated with different glucose concentrations, while the baseline level of insulin was unchanged [19]. Moreover, it was clearly observed that a 50 $mg{\cdot}kg^{-1}$ dose of RSV decreased blood insulin without diminishing blood glucose, supporting the direct insulin-suppressive action of RSV in vivo and in vitro [57].

In conclusion, we demonstrated that CR and RSV decreased glycemia during an OGTT without disturbing the fasting insulin or fasting glucose levels. The fact that glucose decreased in response to a glucose challenge without concomitant changes in fasting insulin levels means that CR and RSV were efficient in enhancing the insulin sensitivity of our animals. These effects were revealed after 33 months of chronic treatment, when the animals were adults; thus, these results are promising and have encouraged us to investigate the impact of these nutritional interventions in old mouse lemurs. The two anti-aging treatments had effects of different amplitudes that potentially rely on different metabolic changes, which suggests that different pathways are involved in their respective responses. One of the hypothetically similar pathways between CR and RSV supplementation involves SIRT1, which we plan to assess in the context of CR and RSV in future investigations. The beneficial effect of RSV appears to be mediated by proteins also involved in CR pathways, such as AMP kinase and PGC-1α, but the precise mechanisms are still unclear [29,17]. However, lowering energy intake by CR or by CR mimetic drugs, such as RSV, protects organisms against diseases and metabolic dysfunctions, in part by hormesis mechanisms that improve cellular stress resistance [58]. Therefore, the possibility of following numerous physiological parameters longitudinally under controlled conditions offers potential value in the context of clarifying the characteristics and kinetics of the effects of CR and RSV on insulin sensitivity, especially because of their potential recommendations for diabetes prevention and care.

Supporting Information

Figure S1 Results of the pilot study. (See the Materials & Methods section in the manuscript.) Plasma glucose concentrations during oral glucose tolerance test in control (CTL; $n = 3$), calorie restricted (CR, $n = 2$) and resveratrol supplemented (RSV, $n = 3$) animals, after 21 months of treatment. There was no difference between the point at 15 minutes and the point at 30 minutes when considering each group (CTL 15 min vs 30 min, $dF = 2$; $t = 0.051$, $p = 0.964$; CR 15 min vs 30 min, $dF = 1$, $t = -1.687$, $p = 0.341$; RSV 15 min vs 30 min, $dF = 2$, $t = -0.679$, $p = 0.567$) Data are expressed as means $\pm$ SEM.
(TIF)

Acknowledgments

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Sandrine Chertouk and Lauriane Dezaire for daily feeding and care provided to the animals. Eric Gueton is recognized for his expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JM FA FP. Performed the experiments: JM. Analyzed the data: JM SB JE FA FP. Contributed reagents/materials/analysis tools: SB JE FA. Wrote the paper: JM FP. Improved manuscript: SB JE FA.

References

1. Weindruch R (2003) Caloric restriction: life span extension and retardation of brain aging. Clinical Neuroscience Research 2: 279–284.
2. Piper MDW, Bartke A (2008) Diet and aging. Cell Metabolism 8: 99–104.
3. Cox LS, Mattison JA (2009) Increasing longevity through caloric restriction or rapamycin feeding in mammals: common mechanisms for common outcomes? Aging Cell 8: 607–613.
4. Anderson SR, Gilge DA, Steiber AL, Previs SF (2008) Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. Metabolism-Clinical and Experimental 57: 347–354.
5. Anderson RM, Weindruch R (2010) Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. Trends in Endocrinology & Metabolism 21: 134–141.
6. Masoro EJ (2000) Dietary restriction and longevity extension as a manifestation of hormesis. Human and Ecological Risk Assessment 6: 273–279.
7. Reaven E, Wright D, Mondon CE, Solomon R, Ho H, et al. (1983) Effect of age and diet on insulin-secretion and insulin action in the rat. Diabetes 32: 175–180.
8. Cartee GD, Kietzke EW, Briggstung C (1994) Adaptation of muscle glucose-transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats. American Journal of Physiology 266: R1443–R1447.
9. Cefalu WT, Bellfarrow AD, Wang ZQ, Sonntag WE, Fu MX, et al. (1995) Caloric restriction decreases age-dependent accumulation of the glycoxidation products, N-Epsilon-(carboxymethyl) lysine and pentosidine, in rat skin collagen. Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences 50: B337–B341.
10. Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, et al. (1994) Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood-glucose in Rhesus-monkeys. American Journal of Physiology 266: E540–E547.
11. Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC (1995) Long-term dietary restriction in older aged Rhesus-monkeys - Effects on insulin-resistance. Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences 50: B142–B147.
12. Lane MA, Ball SS, Ingram DK, Cutler RG, Engel J, et al. (1995) Diet restriction in Rhesus-monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end-points. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 268: E941–E948.
13. Lane MA, Ingram DK, Roth GS (1999) Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. Toxicological Sciences 52: 41–48.
14. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, et al. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in Rhesus monkeys. Science 325: 201–204.
15. Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, et al. (2006) Effect of 6-months calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: A randomized controlled trial. Jama-Journal of the American Medical Association 295: 2482–2482.
16. Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, et al. (2006) The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. Biogerontology 7: 143–148.
17. Baur JA (2010) Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. Mechanisms of Ageing and Development 131: 261–269.
18. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 444: 337–342.
19. Szkudelski T (2006) Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. European Journal of Pharmacology 552: 176–181.
20. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, et al. (2007) Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sciences 80: 1713–1720.
21. Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, et al. (2011) Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus. Age 33: 15–31.
22. Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, et al. (2012) The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing Res Rev 11: 150–162.
23. Stuart JA, Page MM (2010) Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. Mechanisms of Ageing & Development 131: 591–598.
24. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. American Journal of Physiology 237: E214–223.
25. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, et al. (1988) Reduced rate of energy-expenditure as a risk factor for body-weight gain. New England Journal of Medicine 318: 467–472.
26. Jacobson P, Rankinen T, Tremblay A, Perusse L, Chagnon YC, et al. (2006) Resting metabolic rate and respiratory quotient: results from a genome-wide scan in the Quebec Family Study. American Journal of Clinical Nutrition 84: 1527–1533.
27. Weatherall FRS D (2006) The use of non-human primates in research, The Weatherall report.
28. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 444: 337–342.
29. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. Cell 127: 1109–1122.
30. Barrett K, McGrowder D, Brown P, Ragoobirsingh D (2006) Increased PC-1 phosphodiesterase activity and inhibition of glucose uptake in adipocytes of type 2 diabetic rats. Molecular and Cellular Biochemistry 293: 9–14.
31. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C (2005) Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. Pediatrics 115.
32. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis Model Assessment - Insulin resistance and Beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412–419.
33. Aujard F, Perret M, Vannier G (1998) Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology 168: 540–548.
34. Blanc SP, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, et al. (2003) Dubious assumptions underlying the adjustment of metabolic rates for changes in fat-free mass - Authors' response. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 88: 3454–3455.
35. Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, Flier JS (1983) Characterization of the insulin resistance of aging. Journal of Clinical Investigation 71: 1581–1587.
36. Reaven G (2006) Criteria for diagnosing the metabolic syndrome - Reply. American Journal of Clinical Nutrition 84: 1252–1252.
37. Hollenbeck C, Reaven GM (1987) Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 64: 1169–1173.
38. Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, Facta AD, Kreissl MC, et al. (2006) Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. Journal of the American College of Cardiology 47: 1188–1195.
39. Molero-Conejo E, Morales LM, Fernandez V, Raleigh X, Gomez ME, et al. (2003) Lean adolescents with increased risk for metabolic syndrome. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 53: 39–46.
40. Weiss R, Taksali SE, Yeckel C, Kim JK, Caprio S (2004) Relation of insulin sensitivity and IL-6 levels in childhood obesity. Diabetes 53: A419–A419.
41. Llado I, Pons A, Palou A (1999) Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats. Journal of Nutritional Biochemistry 10: 609–614.
42. Walder K, Lee S, Zimmet P, Collier GR (1998) Dysregulation of leptin in response to fasting in insulin-resistant Psammomys obesus (Israeli sand rats). Metabolism-Clinical and Experimental 47: 125–128.
43. Fujimoto S, Mochizuki K, Shimada M, Hori T, Murayama Y, et al. (2010) Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. Life Sciences 87: 679–685.
44. Suwannaphet W, Meeprom A, Yibchok-Anun S, Adisakwattana S (2010) Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. Food and Chemical Toxicology 48: 1853–1857.
45. Reaven GM (1991) Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia - Role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart-disease. American Heart Journal 121: 1283–1288.
46. Pi-Sunyer FX (2007) How effective are lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes mellitus? Nutrition Reviews 65: 101–110.
47. Wing RR, Blair E, Marcus M, Epstein LH, Harvey J (1994) Year-long weight-loss treatment for obese patients with Type-II Diabetes - Does including an intermittent very low calorie diet improve outcome. American Journal of Medicine 97: 354–362.
48. Kirk E, Reeds DN, Finck BN, Mitra MS, Patterson BW, et al. (2009) Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. (vol 136, pg 1552, 2009). Gastroenterology 137: 393–393.
49. Clore JN, Post EP, Bailey DJ, Nestler JE, Blackard WG (1992) Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulin-dependent Diabetes Mellitus after a 3-day fast. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 74: 660–666.

50. Thompson WG, Slezak JA (2006) Correlations between measures of insulin sensitivity and weight loss. Diabetes Research and Clinical Practice 74: 129–134.
51. Fukuda M, Tahara Y, Yamamoto Y, Onishi T, Kumahara Y, et al. (1989) Effects of very low calorie diet weight reduction on glucose tolerance, insulin secretion, and insulin resistance in obese noninsulin dependent diabetics. Diabetes Research and Clinical Practice 7: 61–67.
52. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F (2009) Resveratrol activates energy metabolism by influencing body temperature, locomotor activity and resting metabolic rate in a non-human primate. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 153A: S147–S147.
53. Aubin MC, Lajoie C, Clement R, Gosselin H, Calderone A, et al. (2008) Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: Therapeutic potential of resveratrol. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 325: 961–968.
54. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, et al. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metabolism 8: 157–168.
55. Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings M (2009) Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. Diabetic Medicine 26: 526–531.
56. Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ (2007) Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K-ATP and K-V channels of beta cells. European Journal of Pharmacology 568: 269–277.
57. Szkudelski T (2008) The insulin-suppressive effect of resveratrol - An in vitro and in vivo phenomenon. Life Sciences 82: 430–435.
58. Mattson MP (2008) Dietary factors, hormesis and health. Ageing Research Reviews 7: 43–48.

Etude 2 : Evaluation des dommages du matériel génétique chez le microcèbe : impact d'une restriction calorique ou du resvératrol sur les marqueurs urinaires du stress oxydant cellulaire

Introduction

Selon la «théorie du vieillissement des radicaux libres», introduite par Harman en 1956, les radicaux libres engendrés lors de la respiration cellulaire (mitochondries) causent des dommages, notamment au niveau du matériel génétique (ADN et ARN), qui s'accumulent au cours du temps et qui induisent le processus de vieillissement et la mort (Barja, 1998). Ainsi l'évaluation quantitative de ces dommages fait l'objet d'un grand nombre d'études et l'évaluation des taux (plasmatiques ou urinaires) de nucléosides oxydés semble être un bon outil pour diagnostiquer certaines pathologies comme les maladies neurodégénératives. Une des hypothèses pour expliquer l'effet anti-âge de la RC est la réduction de la dépense énergétique totale accompagnée d'une réduction de la production des radicaux libres et des dommages cellulaires. Il a également été montré que la RC favorise les défenses cellulaires contre divers facteurs de stress en induisant spécifiquement des mécanismes de protection contre les dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires.

Paradoxalement, une perspective différente a émergé plus récemment, suggérant que la RC provoque dans un premier temps une réponse adaptative aux perturbations métaboliques liées à la diminution de la prise alimentaire, promotrice d'activation de mécanismes clés bénéfiques à la survie cellulaire. C'est le concept de «l'Hormèsis», qui propose que l'exposition à un stress chronique et modéré peut avoir un impact bénéfique, conséquence directe de la mise en place de réponses adaptatives cellulaires. La littérature suggère que la relation entre longévité, équilibre énergétique et apport calorique pourrait exister chez l'Homme, mais d'autres investigations sont nécessaires. Le resvératrol (RSV) présente notamment un fort pouvoir antioxydant. Ces effets ont été associés à une induction de la biogenèse mitochondriale accompagnée par une augmentation du matériel génétique des mitochondries ainsi que d'une amélioration des fonctions de ces dernières. L'objectif de cette étude était donc de déterminer si la RC ou le RSV, peuvent diminuer l'apparition et l'accumulation de dommages des macromolécules cellulaires chez le microcèbe (*Microcebus murinus*).

Matériels et méthodes

Des marqueurs du stress oxydatif ont été choisis pour évaluer l'impact de la RC et de l'apport en RSV pendant les 2 premières années de traitement. Six nucléosides (pseudouridine, 1-méthyladénosine, 3-méthyluridine, 2-diméthylguanosine, 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine et 2-désoxyguanosine) ont été choisis, connus pour jouer un rôle important dans le développement de certaines pathologies. De plus, nous nous sommes intéressés à la relation potentielle qui peut exister entre le niveau de stress oxydant et des paramètres de la balance énergétique, puisque cette relation n'est toujours pas certaine et très controversée dans la littérature surtout chez les primates, incluant l'Homme. Par ailleurs, le bilan énergétique est fortement tributaire de la saisonnalité chez les microcèbes qui présentent un gain de masse corporelle important en hiver, induit par un apport énergétique accru et une baisse des dépenses énergétiques alors que pendant la saison estivale, l'augmentation de la dépense énergétique est responsable d'une réduction de la masse corporelle. Nous avons donc évalué la composition corporelle, ainsi que le taux de métabolisme de repos corrigé pour les variations de composition corporelle liées à la saison.

Résultats

Les résultats obtenus concernant les deux premières années de l'étude longitudinale RESTRIKAL, représentent une évaluation du niveau du stress oxydatif global chez des individus âgés de 3-4 ans. Nous nous sommes concentrés sur l'influence potentielle des traitements sur le niveau de stress oxydant, en recherchant également un lien avec les paramètres de la balance énergétique chez le microcèbe. Cette étude fournit des évidences quant à l'accumulation de certains nucléosides endommagés, causés par le stress oxydatif avec l'âge chez les animaux contrôles. Ceci n'a pas été mis en évidence chez les animaux traités, bien que la restriction calorique et l'apport en resvératrol ont, après 6 mois de traitement, significativement augmenter la quantité de marqueurs urinaires du stress oxydant puis on diminuer avec la durée de traitement. Par ailleurs, nos résultats ne soutiennent pas la théorie selon laquelle le métabolisme énergétique est directement lié à l'accumulation des dommages cellulaires impliquée dans le processus de vieillissement, et ils ne vont pas non plus dans le sens de la théorie de Harman (free radical theory of aging, 1956) mais plutôt dans le sens de la théorie de l'Hormésis (mito-hormésis) au regard des résultats trouvés chez les animaux traités.

Discussion

La théorie du vieillissement relative aux radicaux libres et au stress oxydatif (Harman, 1956) fournit un mécanisme potentiel pour expliquer l'augmentation des dommages cellulaires avec l'âge et la relation supposée entre l'augmentation du métabolisme et la durée de vie. Cependant, il existe toujours une controverse considérable quant à savoir si les dommages oxydatifs augmentent avec l'âge. La relation trouvée entre la quantité de nucléosides oxydés et l'âge chronologique uniquement chez les animaux du groupe contrôle témoigne que le vieillissement chez le microcèbe peut être associé à une augmentation des dommages macromoléculaires. Les niveaux de marqueurs urinaires n'étaient cependant pas significativement plus élevés comparés aux animaux traités. Ceci peut-être dû au fait que les animaux étaient seulement âgés de 3 à 4 ans (l'âge moyen étant d'environ 5 ans chez cette espèce). Par ailleurs, chez les individus sains, l'accumulation du stress oxydatif peut être faible et peut nécessiter une analyse à plus long terme pour observer une accumulation quantitative des dommages et d'autre part pour détecter des effets induits par des protocoles nutritionnels dans un contexte thérapeutique. De plus le dosage urinaire fournit une évaluation « générale » du bilan oxydatif de l'organisme, pouvant ainsi estomper les différences qui peuvent exister entre les différents organes ou tissus, comme le stress oxydatif est connu pour être plus élevé au niveau des tissus musculaires par exemple. De ce fait l'évaluation des effets bénéfiques potentiels des traitements, restriction calorique et resvératrol, est plus difficile. Mais nous avons observé qu'avec la durée des traitements les taux de marqueurs urinaires viennent à diminuer, fait significativement marqué chez les animaux supplémentés en resvératrol, confortant les résultats de la littérature démontrant son rôle antioxydant.

Calorie restriction or resveratrol supplementation prevented age-related DNA and RNA oxidative damages in a non-human primate

Authors: J. Marchal[1], A. Dal-Pan[1], J. Epelbaum[2], S. Blanc[3], S. Mueller[4], M. Wittig Kieffer[4], F. Metzger[4], F. Aujard[1] and the RESTRIKAL consortium

[1] Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France

[2] Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

[3] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département d'Ecologie, Physiologie, Ethologie UMR 7178 CNRS Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

[4] F. Hoffmann-La Roche AG, pRED, Pharma Research & Early Development, CH-4070 Basel, Switzerland

Abstract

Oxidative stress is a key factor in the aging process and in the development of age-related diseases. Since nutritional interventions such as caloric restriction (CR) delay the onset of age-related diseases and increase the lifespan of many species, the impact of a moderate CR was tested on adult mouse lemurs (*Microcebus murinus*), and compared with a potential mimetic, resveratrol (RSV), a polyphenol naturally found in grapes. We hypothesized that both CR and RSV impact oxidative DNA and RNA damages compared to standard-fed control (CTL) animals. Adult male grey mouse lemurs were assigned to three dietary groups: a CTL group, a CR group receiving 30% fewer calories than the CTL and a RSV group receiving the CTL diet supplemented with RSV (200 $mg \cdot day^{-1} \cdot kg^{-1}$). Oxidative stress was estimated after 3, 9, 15 and 21 months of treatment using measurement of oxidized nucleosides in urine samples by mass spectrometry. Resting metabolic rate and adjusted for changes in body composition was also measured to assess the potential relationships between these oxygen consumption and oxidative damage markers. In this photoperiod-dependent heterotherm primate, seasonal variations in oxidative stress were observed, probably due to a seasonal-dependent, cost-benefit trade-off between torpor use and oxidative stress. This study provides evidence for oxidative stress accumulation with age. Dietary interventions resulted in a short term increase in oxidative stress levels followed by reduced levels with increasing age.

Keywords: calorie restriction, resveratrol, urinary oxidized nucleosides, grey mouse lemur

Introduction

According to the "free radical theory of aging" (FRTA) introduced by Harman in 1956, free radicals produced during the aerobic respiration cause cumulative damages which result in the aging process and death (Harman, 1999). Increasing numbers of oxidized-related DNA lesions are proposed to be relevant biomarkers of disease development or aging (Evans et al., 2004). Biomarkers of oxidative-related damaged DNA have been used to examine mechanistic relationships between DNA damage, disease and the efficacy of potential therapies. Increasing evidence supports a role for oxidative DNA damage in aging and several diseases including mild cognitive impairment and Alzheimer's disease (AD) (Lovell and Markesbery, 2007; Mao and Reddy, 2011; Ramamoorthy et al., 2012). Thus, assessment of DNA damage has been increasingly undertaken for over twenty years and the evaluation of oxidized nucleosides levels has become a tool to diagnose diseases such as neurodegenerative diseases (Maruszak et al., 2006). Indeed, oxidized nucleosides levels increase in human is associated with dementia or Alzheimer diseases compared to normal subjects (Lee et al., 2007).

Calorie restriction (CR) without malnutrition delays the onset of age-associated pathologies and increase lifespan in several species (see for review, Speakman and Mitchell, 2011). One hypothesis to explain the anti-aging effect of CR is reduced energy expenditure with consequent reduction in reactive oxygen species (ROS) which causes molecular damages (Merry, 2004). CR promotes increased stress defences and specifically induces protective mechanisms against oxidative damage of cellular macromolecules (Masoro, 1998; Barros et al., 2004). Indeed in mammals, CR enables a reduction of mitochondrial free-radicals associated with a decrease in total energy expenditure (Bevilacqua et al., 2004), thus reduction in free-radicals is often interpreted as a consequence of reduced resting metabolic rate (RMR). Recently, the CALERIE study (Rochon et al., 2010) reported a beneficial CR effect (-25% for 6 months) in non-obese adult human subjects. Indeed CR enabled a decrease in daily energy expenditure, fasting insulin, DNA damages and changes in body composition (Redman et al., 2008; Redman et al., 2009) demonstrating that even 6 months of CR may induce metabolic adaptations favourable in delaying age-related decline.

In rodents, CR elicits mitochondrial proliferation (Lambert et al., 2004), without necessarily affecting mitochondrial oxygen consumption (Lopez-Lluch et al., 2006); thereby inducing an adaptive response to specific metabolic alterations in states of reduced food

uptake. This supports, in the aging context, the concept of "hormesis" which proposes that the exposition to chronic and mild stress exerts a beneficial impact through such adaptive cellular responses (Rattan, 2004). Observational data suggest that the relationships between longevity, energy balance and calorie intake could exist in humans too but further investigations are needed (Redman and Ravussin, 2011). In the past 5 years, numerous studies focused on the development of "CR mimetic" compounds that would minimize many age-related diseases in humans without a reduction in calorie intake (Weindruch et al. 2001; Ingram et al. 2007; Wakeling et al. 2009). Among these CR mimetic compounds, resveratrol (RSV) seems to be a promising molecule (Howitz et al. 2003; Lagouge et al. 2006; Anderson and Prolla 2009; Catalgol et al., 2012), displaying anti-inflammatory (Donnelly et al. 2004), anti-cancer (Baur et al. 2006), metabolic and cardiovascular protection properties (Wu et al., 2011; Voloshyna et al., 2012). Interestingly, in mice, *in vivo* and *in vitro*, RSV exerts a strong anti-oxidant effect (Iannelli et al. 2007; Rocha et al., 2010). RSV induces mitochondrial biogenesis by increasing their size and their mtDNA quantity against obesity and insulin resistance (Baur et al., 2006). Although RSV effects share many metabolic similarities with CR (Barger et al. 2008), its metabolic effects in primates and especially on oxidative stress level are poorly documented.

While the Harman's FRTA theory is still debated (see for review Poljsak et al., 2011), evidences about relation between metabolism and energy balance regulation and oxidative stress are lacking. The main objective of this study was thus to determine whether CR or RSV, a potential mimetic compound, can delay age-related DNA and RNA damages. This study occurred within the RESTRIKAL program (Dal-Pan et al., 2011), started in 2008, which investigates the long-term effects of CR or dietary RSV supplementation on physiological and behavioral parameters throughout the aging process in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). Based on their potential maximum survival of 12 years in captivity, mouse lemurs have been used in numerous age-related studies (for a review, see Languille et al., 2012), for testing hypotheses of aging and especially the mechanisms behind the beneficial effect of anti-aging protocol such as CR and RSV intake (Dal-Pan et al., 2011; Marchal et al., 2012).

Six nucleosides (pseudouridine, 1-methyladenosine, 3-methyluridine, 2-dimethylguanosine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 2-deoxyguanosine) known to be key parameters of oxidative stress and playing an important role in a wide range of age-related pathogenesis (see for review, Cook et al., 2008), were selected to assess changes with

chronological aging and diet. Furthermore, a potential relation between oxidative stress level and energy balance parameters was investigated, as it is unknown if there is a relationship with oxidative stress in non-human primates and whether these are related to the aging process.

Materials and methods

Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). The Research was conducted under the authorization number 91–305 from the ‘‘Direction Départementale des Services Vétérinaires de l’Essonne’’ and the Internal Review Board of the UMR 7179. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, ‘‘The use of non-human primates in research’’, special attention was paid to the welfare of animals during this work to minimize nociception (Weatherall D., 2006).

Animals and husbandry

All grey mouse lemurs studied were males, born in the laboratory breeding colony of Brunoy (Muséum National d’Histoire Naturelle, UMR 7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773). They currently are part of the RESTRIKAL study (see Dal-Pan et al., 2011 for details). Animals were exposed at ambient room temperature (24–26 °C) and relative humidity (55%). In captivity, seasonal variations of physiological and behavioral functions were entrained by alternating 6-month of long-day (LD) photoperiod (14 h of light / day) and 6-month of short-day photoperiod (SD) (10 h of light / day) under artificial light (fluorescent tubes; white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Forty-height animals were used. The tests were performed after 3, 9, 15 or 21 months of treatment (see Table 1). In the present study, mouse lemurs were studied during both the SD and LD periods. Measurements were made at least two months after the onset of the previous SD or LD season. Physiological status of the animals was thus stabilized. To minimize social influences, animals were housed individually in cages (50 * 40 * 30 cm) visually separated from each other. All tests were realized during the last 4 hours before their

daily active phase. The body mass of each animal was measured every week during the study to monitor body mass variations.

Dietary interventions

As previously described (Dal-Pan et al, 2011), animals were fed with fresh fruits and a daily mixture made up of French cheese, ginger bread, cereals, concentrated milk and egg. Water was always given *ad libitum*. Forty-eight animals were used in this study, randomly distributed into three different dietary groups at the age of 38±1 months: an *ad libitum* CTL group, a group of animals submitted to CR that were fed the same diet but received 30% less than CTL and a third group of animals supplemented with RSV that were fed the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of RSV per kilogram body mass per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 5.4 $mg/kg.d^{-1}$ of Baur et al. (2006) and the 400 $mg/kg.d^{-1}$ of Lagouge et al. (2006). In order to know the exact quantity of food ingested by the animals, daily leftover were measured and corrected for water evaporation. In this study, measurements were performed on one cohort of animals followed for oxidative stress markers in the SD and LD seasons within the first year of treatment and also followed until their second SD and LD seasons (see Table 1).

	Year 1			Year 2		
	CTL	**CR**	**RSV**	**CTL**	**CR**	**RSV**
	n=13	*n=18*	*n=17*	*n=6*	*n=5*	*n=6*
Short-day season (SD)	42.5±1.6	42.3±1	40.0±0.8	53.2±2.1	53.8±1.7	52.2±2
	n=13	*n=16*	*n=17*	*n=10*	*n=9*	*n=10*
Long-day season (LD)	47.8±1.5	48.4±1.1	46.6±0.9	60.4±1.8	59.8±1.1	58.0±1

Table 1. *Characteristics of studied mouse lemurs. Sample size and averaged age in months (mean±SEM) for each diet groups (CTL: control group; CR: restricted group; RSV: group receiving RSV), according to seasons (SD and LD) and year of treatment (Year 1 and Year 2).*

The total numbers of animals in the SD of the second year of treatment is less important than the other points of study. Indeed we chose to test more animals during the LD

season as this photoperiod corresponds to the active season in this species, conversely of the SD resting season.

Urine samples collection

The mouse lemurs were placed individually into metabolic cages on the morning of day 1. They were left in habituation until the next morning (day 2) to avoid modification in urine markers due to the stress of environmental changes. The urine collectors (funnels and tube recuperator) were placed in the late morning of day 2 in a refrigerated thermos at 4°C. On the morning of day 3, mouse lemur were returned into their own cages and urine samples were collected in cryogenically stable tubes immediately stored at - 20°C until analyses by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS).

Measurement of urinary oxidized nucleosides levels

Urinary oxidized nucleosides: pseudouridine (PSU, µM/µMc), 1-methyladenosine (1MA, nM/µMc), 3-methyluridine (3MU, µM/µMc), 2-dimethylguanosine (2DMAG, µM/µMc), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2DG, nM/µMc) and 2-deoxyguanosine (2DOG, nM/µMc) were assayed by LC/MS as follows: 10µl of urine was diluted 1/10 with mobile phase A containing the internal standards 8-Bromo-D-guanosine (8BrDG) and $^{15}N_5$-Guanosine (15N5G). 10 µl of the mixture were injected in duplicates into the LC/MS system which consisted of a CTC autosampler, an Agilent 1200 binary pump and an AB Sciex API5000 triple quadrupole mass spectrometer operated in positive ion turbo electrospray mode. The LC column was a Zorbax Xtend C18 of 21. x 50mm, the mobile phase A was 10% MeOH/90% 2mM aqueous ammonium acetate, mobile phase B was 80% methanol/20% 2mM ammonium acetate. The flow rate was set to 200 µl/min (110 bar) and retention times between 1.7 and 8.2 minutes. The gradient settings were as follows: 0min 0%B, 3.3min 0%B, 5min 20%B, 8min 40%B, 9min 40%B, re-equilibration until 15min. The mass spectrometers acquisition parameters (150ms dwell time) are listed in Table 2. Calibrator samples were prepared by spiking pool mouse urine obtained from the in-house animal husbandry. A weighted linear regression was done on the calibrators' peak area ratios. The unknown samples' concentrations were calculated by division of the peak area ratios by the slope of the calibration curve. This calculation method removes the error obtained when the MS supplier software is used for a calibration with endogenous analyte content.

Name	Transition m/z	Declust.Potential V	Coll.energy V	Coll. exit pot V
BrDG	362.2>230.0	45	20	16
PseudoU	245.1>209.1	50	20	15
2-DMAG	313.2>181.1*	60	25	12
8-OHDG	284.1>168.1	55	20	10
1-CH3A	283.1>151.0*	40	30	20
2-DG	268.0>152.1	35	16	18
3-CH3U	259.1>96	40	50	15
Interface settings: Ion spray voltage, 5kV, collision gas, N_2 at setting 5, all other gases N_2 optimized for 200 µl/min, temperature 550°C, extracting potential EP at 10V.				

Table 2. *The mass spectrometers acquisition parameters (150ms dwell time). * these transitions are isotope peaks of the most abundant analytes to overcome the enormous concentration differences between them.*

Body composition assessment

Energy balance is highly dependent on seasonality in mouse lemurs which exhibit an important body mass gain in winter-like season, induced by increased energy intake and lower energy expenditure while during the summer-like season, the increase in energy expenditure is responsible for body mass drop. Thus body mass and RMR were monitored twice a year in the first weeks following each seasonal shift (SD1, LD1, SD2, LD2). Fat-free mass (FFM) was calculated from total body water measurement (TBW) by isotopic dilution as previously described (see Dal-Pan et al., 2011 for details), assuming a hydration coefficient of 73.2%, which is unchanged by chronic CR (Blanc et al., 2005). Fat mass (FM) was calculated as the difference of FFM from body mass. FFM and FM were expressed in g and FFM/FM ratio was calculated.

Resting metabolic rate

Oxygen consumption was measured with a closed-circuit respirometer one month before the urine samples for oxidative stress measurements for each season (SD and LD) and for both year of treatment. Mouse lemurs being a nocturnal species, RMR measurements were

performed during their daily resting period, 4–6 h after the beginning of the light period, to avoid torpor metabolism. Animals were trained to nest in the respiratory chamber, which consisted of 2.5-L opaque chamber with a woven floor to absorb any urine. During the experiment, the respiratory chamber was placed in a cabinet at a controlled ambient temperature of 25.0±0.5°C, a value within the thermo-neutral zone defined for the mouse lemur (Aujard et al., 1998). After a 20 min habituation phase under constant airflow ventilation (2 $L \cdot min^{-1}$) through the respirometer chamber from bottom to top, the chamber was closed for 40 min. The VO_2 consumed by the animal was calculated from the initial and final concentrations of O_2 in the chamber as measured on dried gas using a Servomex 570 A paramagnetic gas analyzer (accuracy 0.01% O_2). The analyzer was routinely calibrated with N_2 and atmospheric air. O_2 consumption was expressed as mL $O_2 \cdot h^{-1}$ and was adjusted for body composition variations (FFM) of mouse lemurs.

Data analysis and statistics

The Shapiro-Wilk goodness-of-fit test was applied to determine whether the sample data were likely to derive from a normally distributed population. Most variables were not normally distributed, thus all urinary nucleoside levels were logarithmically transformed for analysis. Data were analyzed with linear mixed effect models (LME), built with the 'nlme' function (Pinheiro et al., 2005) in R 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Normality of models' residuals was checked by plotting normal quantile-quantile and Q-Q line. Explanatory variables were the fixed effects of treatment (Diet effect; CTL versus CR or CTL versus RSV), of seasonality (Season effect; SD versus LD), and of treatment duration (Time effect; Year 1 versus Year 2) and all their interactions. Inter-individual variability was accounted for by declaring individual identity as random effects (between-individual variation in intercepts). The final restricted maximum-likelihood model, including only significant effects was achieved by deletion of the non-significant interactions and additive effects from the primary model, using ANOVA analysis to compare one model with another. The F-tests of the significance of effects were computed with models derived from the final model. For RMR values analysis, FFM was considered as a covariate into the model.

Simple linear regressions, using Pearson formula, were also used to determine the significance levels of correlation between urinary markers of oxidative stress and energy balance parameters (RMR). Simple linear regressions were also used to determine the significance levels of correlation between urinary markers of oxidative stress and

chronological age (months). A level of $p < 0.05$ was set for significance, and all values are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM).

Results

Body mass, resting metabolic rate and body composition

Values of body mass, resting metabolic rate and FFM/FM ratio are given in Table 3.

Body mass varied significantly among the three diet groups, between seasons and across time (Table 3 & 4). While body mass of CTL and RSV animals did not differ (t_{50}=-0.69, p=0.49) CR animals exhibited a significant lower body mass when compared to CTL (t_{50}=-3.08, p<0.01). Body mass of mouse lemurs was lower in LD season than in SD season whatever the diet group (t_{110}=-15.08, p<0.001) and was generally higher in the second year of treatment (t_{110}=2.48, p=0.02).

There was a significant effect of treatment, season and time on absolute RMR adjusted for FFM values (Table 4). While RMR levels for CR animals were not significantly different from those expressed by CTL animals (t_{50}=0.28, p=0.28), RSV animals exhibited higher values when compared to CTL animals (t_{50}=2.19, p=0.03). Moreover, RMR levels were lower in LD season compared to the SD season (t_{88}=-2.76, p<0.01). They were also decreased during the second year of treatment (t_{88}=-4.82, p<0.001) in both SD and LD seasons independently of diet, when compared to the first year of treatment.

FFM/FM ratio varied significantly with season while there was no effect of diet or of time (Table 4). This ratio was higher during the LD compared to the SD season (t_{90}=3.21, p<0.001) suggesting a decrease in FM during the active period, as expected in this species.

	Year 1			Year 2		
	CTL	CR	RSV	CTL	CR	RSV
Body mass (g)						
Short-day season (SD)	121.98±4.53 n:13	110.67±4.03 n:18	119.59±4.39 n:17	121.72±10.80 n:6	103.11±9.88 n:5	127.16±11.25 n:6
Long-day season (LD)	95.76±5.39 n:13	77.93±2.05 n:16	92.10±3.42 n:17	100.49±5.90 n:10	83.65±4.02 n:9	101.33±4.48 n:10
RMR (mL O_2/h)						
Short-day season (SD)	117.2±6.3 n:13	109.8±4.4 n:18	121.4±4.6 n:17	87.2±8.5 n:6	91.1±7.7 n:5	100.6±6.1 n:6
Long-day season (LD)	100.4±5.9 n:13	90.8±5.2 n:15	115.8±7.8 n:16	81.8±8.1 n:6	95.7±11 n:4	100.4±10.3 n:4
FFM/FM ratio						
Short-day season (SD)	2.07±0.22 n:13	2.16±0.21 n:18	1.86±0.16 n:17	1.75±0.59 n:6	2.02±0.17 n:5	1.98±0.51 n:6
Long-day season (LD)	3.27±0.37 n:13	3.94±0.53 n:14	3.6±0.47 n:14	3.63±1.1 n:6	2.89±0.66 n:4	3.23±1 n:5

Table 3. *Values of energy balance parameters in mouse lemurs. Means and SEM for body mass, resting metabolic rate (RMR) adjusted for fat-free mass (FFM) and FFM/FM (fat mass) ratio for each diet groups (CTL: control group; CR: restricted group; RSV: group receiving RSV), according to seasons (SD and LD) and year of treatment (Year 1 and Year 2).*

Effects	*dF*	*X² (L-ratio)*	*p-value*	*X² (L-ratio)*	*p-value*	*X² (L-ratio)*	*p-value*
		Body mass (g)		RMR (mL O_2/h)^{FFM}		FFM/FM ratio	
Treatment	2:7	**10.60**	**0.005**	**6.01**	**0.049**	1.54	0.46
Season	1:7	**123.8**	**<0.001**	**7.25**	**<0.01**	**10.07**	**<0.001**
Time	1:7	**6.06**	**0.01**	**20.11**	**<0.001**	0.47	0.49
Treatt*Season	2:12	1.48	0.47	1.17	0.55	2.55	0.27
Treatt* Time	2:12	4.48	0.10	3.93	0.13	0.24	0.88
Season*Time	1:12	0.62	0.43	1.49	0.22	0.65	0.41

Table 4. *Linear mixed model effect analysis on energy balance parameters. Effects of treatment (CR and RSV versus CTL), season (SD versus LD) and time (Year1 versus Year2) on energy balance parameters in mouse lemurs. Significant effects are in bold characters,*

*when p<0.05. * represents cross effects.* ^{FFM} *: RMR values were adjusted for FFM changes by taking FFM as covariate (p<0.001).*

Oxidized nucleosides

Results of analysis for oxidized nucleosides are given in the Table 5 and illustrated on Figure 1.

Peudouridine measurements revealed a significant time effect, with higher levels in the second year of treatment compared to the first one (log, 2.61±0.04 vs 2.51±0.04, t_{111}=2.37, p=0.02) regardless of treatment and season.

3-methyluridine levels were strongly decreased in LD season compared to SD season (log, -2.82±0.04 vs -3.105±0.03, t_{111}=-6.11, p<0.001), but they did not differ among diet groups. They were almost increased (p=0.05) in the second year of treatment when compared to the first, regardless diet and season.

1-methyladenosine levels varied between treatments. When compared to CTL animals, values of CR animals (log, -3.59±0.12 vs -4.34±0.13, t_{50}=3.38, p<0.01) and of RSV animals (log, -3.66±0.11 vs -4.34±0.13, t_{50}=2.73, p<0.01) were higher. 1MA levels were also higher in the second year of treatment as compared to the first (-3.69±0.1 vs -3.89±0.1, t_{111}=2.2, p=0.03).

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels dramatically decreased by 40% in LD season when compared to SD (log, 0.316±0.06 vs 0.791±0.06; t_{112}=-6.65, p<0.001) independently of treatment and time.

2-deoxyguanosine levels did not differ within diet groups, nor between seasons and across time.

2-dimethylguanosine concentrations decreased during LD compared to SD season (log, -0.286±0.05 vs -0.394±0.03, t_{111}=-1.90, p=0.05). Additionally, a significant crossed effect was observed between treatment and season. Compared to CTL, CR animals presented an increase of 2DMAG levels in SD season (t_{107}=2.21, p=0.02) while 2DMAG levels remained stable during the LD season (t_{107}=0.78, p=0.43). In RSV animals as well, 2DMAG levels were increased in SD season (t_{107}=2.89, p<0.01) while they did not vary in LD season (t_{107}=0.06, p=0.94). Finally, 2DMAG levels varied with season across time independently of treatment, increasing during the SD season between both years of treatment (log, -0.328±0.06

vs -0.133±0.07, t_{108}=3.17, p=0.01) and dropping in LD season when comparing the two years of treatment (log, -0.352±0.04 vs -0.464±0.07, t_{108}=-2.38, p=0.02).

Effects	*dF*	*X² (L-ratio)*	*p-value*	*X² (L-ratio)*	*p-value*	*X² (L-ratio)*	*p-value*
	PSU			3MU		1MA	
Treatment	2:7	1.19	0.55	5.57	0.06	**11.98**	**0.002**
Season	1:7	1.63	0.20	**32.77**	**<0.001**	0.01	0.91
Time	1:7	**6.32**	**0.01**	**3.84**	**0.05**	**7.41**	**0.006**
Treatt*Season	2:12	0.04	0.98	5.42	0.06	1.02	0.59
Treatt* Time	2:12	2.99	0.22	1.37	0.50	2.14	0.34
Season*Time	1:12	0.002	0.96	0.99	0.31	3.03	0.06
	8OH2DG			2DOG		2DMAG	
Treatment	2:7	1.53	0.46	4.65	0.09	4.43	0.10
Season	1:7	**36.87**	**<0.001**	2.21	0.13	**3.54**	**0.05**
Time	1:7	1.07	0.29	0.01	0.91	0.09	0.76
Treatt*Season	2:12	0.29	0.86	2.53	0.28	**9.35**	**0.009**
Treatt* Time	2:12	4.08	0.11	4.48	0.11	4.03	0.13
Season*Time	1:12	2.01	0.15	0.77	0.37	**6.64**	**0.009**

Table 5. *Linear mixed model effect analysis of oxidized nucleosides. Effects of treatment (CR and RSV versus CTL), of season (SD versus LD) and of time (Year1 versus Year2) on urinary oxidized nucleosides in mouse lemurs. Significant effect are in bold characters, when p<0.05. All variables were log transformed. * represents cross effects.*

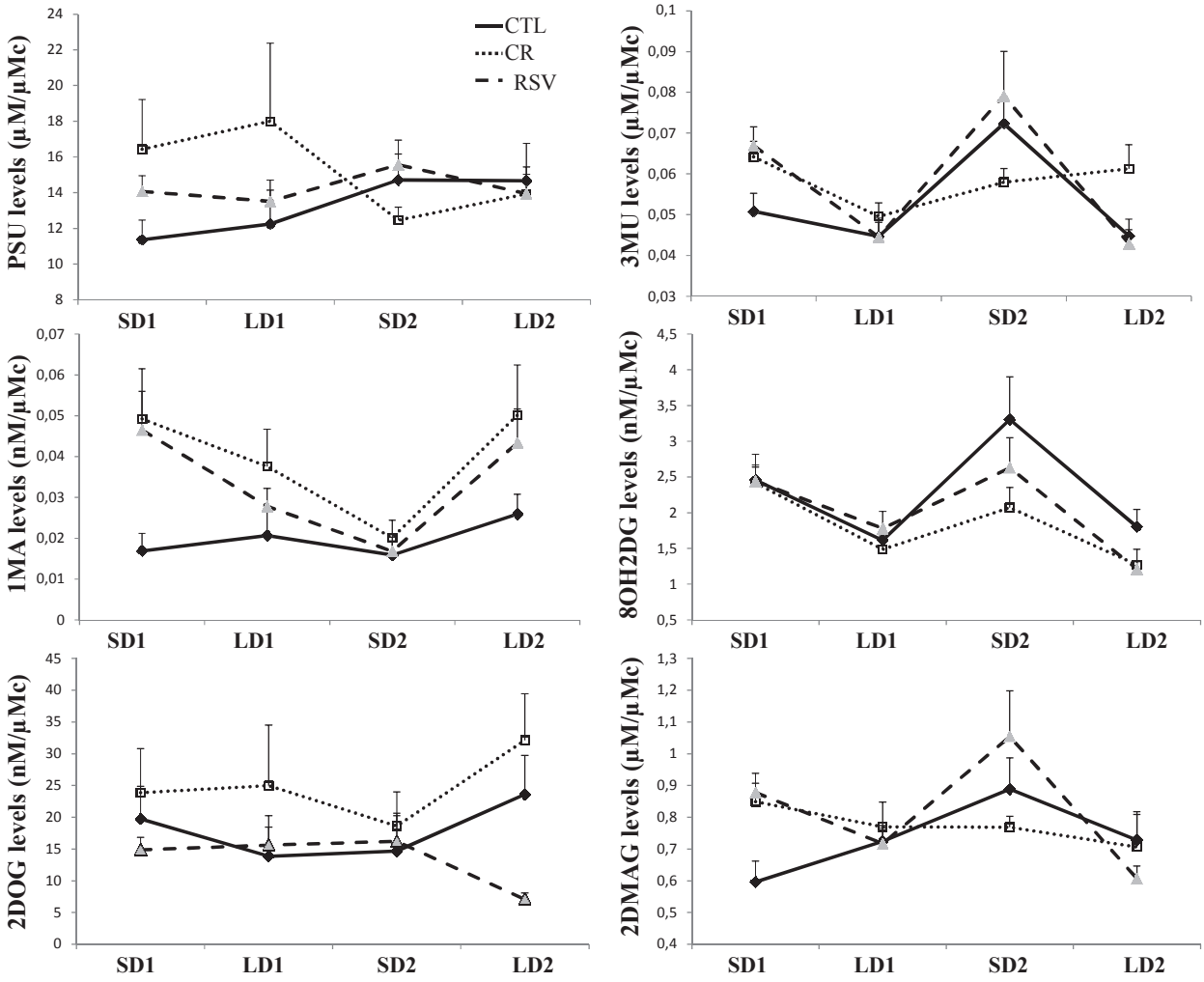


Figure 1. *Evolution of oxidative stress markers across seasons and years of treatment. Means and SEM of oxidized nucleosides levels for each diet groups (CTL: control group; CR: restricted group; RSV: group receiving RSV) and for each time measurement: SD1: short-day season of year 1; LD1: long-day season of year 1; SD2: short-day season of year 2 and LD2: long-day season of year 2. Significance was considered when p<0.05.*

Relationships between oxidative stress markers and energy balance parameters

We found a positive relation between body mass and urinary levels of 2DOG and 8OH2DG only in RSV treated animals in LD season (2DOG: r=0.38, p=0.02; 8OH2DG: r=0.57, p<0.001) nevertheless this relation was nonexistent for the others oxidized nucleosides.

There was no relationship between FFM adjusted RMR and any of the markers of oxidative stress. Equally, the FFM/FM ratio was not related to any oxidized nucleosides measures.

Relation with chronological age

Relationship between oxidized nucleosides and animals' chronological age in months are summarized in Table 6. Simple linear regressions were performed by regrouping both years of treatment but with diet and season as grouping variables. Clearly, as regards PSU, 2DMAG and 3MU levels, there were significant positive correlations between these nucleosides levels and chronological age in CTL animals during the short-day photoperiod (PSU: $r=0.52$, $p<0.01$; 2DMAG: $r=0.51$, $p<0.01$ and 3MU: $r=0.46$, $p=0.01$). Interestingly, these correlations did not exist in CR and RSV treated animals or during the LD season.

By contrast, there were negative relations between oxidized nucleosides levels and chronological age, in RSV animals during the LD season, for 2DOG ($r=-0.32$, $p=0.03$) and 80H2DG ($r=-0.36$, $p=0.02$), although there was no correlation in CTL or CR animals, nor during the SD season.

Dependent variables	Independent variable	Season	CTL	CR	RSV
PSU[$]	Chronological age (months)	Short-day	**r=0.52 p<0.01**	NS	NS
2DMAG[$]			**r=0.51 p<0.01**	NS	NS
3MU[$]			**r=0.46 p=0.01**	NS	NS
8OH2DG[$]	Chronological age (months)	Long-day	NS	NS	**r=-0.36 p=0.02**
2DOG[$]			NS	NS	**r=-0.33 p=0.03**

Table 6. *Simple linear regression of oxidized nucleosides levels with chronological age. Chronological age is expressed in months. CTL: control group; CR: restricted group; RSV:*

group receiving RSV. Significance was considered when $p<0.05$; r: Pearson correlation coefficient; NS: non-significant; $^{\$}$: variables were log transformed.

Discussion

Results from the first two years of the RESTRIKAL longitudinal study provide evidence for 1) an accumulation in oxidative stress with normal aging, 2) that dietary interventions increase oxidative stress levels on the short-term, and 3) reduce it with increasing treatment duration.

Evolution of age on oxidative DNA and RNA damages

A positive relation between chronological age, and levels of four oxidized nucleosides out of six (PSU, 2DMAG, 1MA and 3MU) was observed in CTL animals, especially in the short-day resting season. This concurs with the free radical/oxidative stress theory of aging (Harman, 1956) according to which cellular damages increase with metabolism changes across lifespan. However, there is still considerable controversy over whether oxidative damage increases with age (Poljsak et al., 2011). The present age-associated decrease in RMR values when adjusted for body composition changes in CTL and treated animals, support previous findings (Pears et al., 1998). Firstly, in the present study, the lack of a marked increase of oxidized nucleosides in the mouse lemur may reflect the fact that animals were only 3 to 4 years old on average, considered middle-aged (Languille et al., 2012), even though the age distribution allowed to show positive relationship between nucleosides levels and age. Secondly, the urinary assay provides a method for general evaluation of the whole oxidative stress in the organism, erasing the difference which may exist between organs, as oxidative stress is higher in muscle than in others tissues. Moreover, an observable accumulation of oxidative stress seems to be dependent on the choice of markers. The ones we chose are particularly used for screening pathologies of aged humans such as in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Lee et al., 2007). Likewise, the type of substrate studied play a key role in the determination of oxidative stress levels. For example, oxidative damage to DNA and proteins was increased in skeletal muscle of older patients and was decreased in blood cells (Gianni et al., 2004; Heilbronn et al., 2006).

Impact of nutritional protocol on oxidized nucleosides

Compared to CTL animals, an effect of diet was found for CR and RSV animals with higher levels of 1-methyladenosine and 2-dimethylguanosine. These findings demonstrate that short-term CR and RSV treatment may induce, an initial "adaptive" response resulting in higher oxidative stress. Interestingly, eventhough animals under RSV treatment exhibited no difference in their body mass, their FFM adjusted RMR were higher when compared to CTL animals, but no relation was found between oxidized nucleosides levels and energy balance parameters, demonstrating that metabolism may not be immediately engaged in the aging process through the production and accumulation of ROS and macromolecule damages. However, for 8OH2DG and 2DOG; both guanosines DNA related damage markers; a negative relation with age was observed in RSV treated animals during the LD season.

Several hypotheses have been proposed concerning the biological mechanisms underlying the life-extending and anti-aging actions of CR, among which the attenuating oxidative cellular damages (Gredilla et al. 2001; Park et al., 2012). It was proposed that maximum life span is inversely proportional to the amount of metabolized nutritive energy. Studies in rodents subjected to CR disclosed a 30% decrease in 8-oxodG in specific tissues such as brain and muscle (Dubey et al., 1996; Sohal et al., 1994). Anti-oxidant properties of RSV may also counteract the age-related increase in oxidative stress by promoting mitochondrial biogenesis and functions. Such processes were previously reported to occur in RSV fed mice which manifested consistently attenuated oxidative damage in tissues such as liver, heart and kidney and reduced the observed age-dependent accumulation of 8OH2DG in liver and heart (Wong et al., 2009). We were thus expecting decreased levels of urinary oxidative stress in both treated animals compared to CTL ones.

However, other studies suggested that CR may cause an adaptive response to specific metabolic alterations. CR induced an energy deficit which possibly enhances mitochondrial activity to counteract the energy depletion (Sharma et al., 2010; Zuin et al., 2010). So, in conflict with the Harman's free radical theory of aging, ROS may actually act as essential, and potentially "lifespan promoting" molecules which transduce signals from the mitochondria to other cell organites. CR diet could act, initially, by inducing chronic low-level stress that induces an increased stress resistance by improving mitochondrial functions and ultimately longevity (Masoro, 1998). This would reflect an adaptive response commonly defined as hormesis or mitochondrial hormesis (Calabrese et al, 2007). Apparently, RSV

treatment as potential anti-aging therapy beneficially impacted some nucleoside levels in mouse lemurs over a period of two years of treatment, even when started in adult-stage. The beneficial effects of RSV on decreasing oxidative stress levels have been suggested to mimic CR in invertebrates and rodents. The present study demonstrated a change in the evolution of oxidized nucleoside level with age in both CR and RSV animals. Indeed, positive correlations were not detected in CR treated animals, supporting the action of diet on age-related effect on these parameters and reinforcing the potential mimetic effect of RSV as compared to CR. The oxidative stress increase induced by CR and RSV treatment at early stage of the study in mouse lemurs may correspond to an adaptive response, based on cellular mechanisms, promoting a stress resistance in treated animals, maybe only viewable at a more advanced age in this species.

3MU, 8OH2DG and 2DMAG levels were markedly higher in the SD season than in the LD season independently of nutritional treatments. This is paradoxical since metabolism and oxidative damages normally increases with spontaneous activity (Monhagan et al., 2009), higher in LD season in the grey mouse lemurs (Giroud et al., 2008).

This seasonal difference was not related to body composition, as FFM/FM ratio did not differ between groups. In previous studies, mouse lemurs fattened quickly when exposed to a SD photoperiod and, after 2–3 months, they spontaneously reduced their calorie intake (Génin and Perret 2000, Dal-Pan et al., 2011). Consequently, percentage of CR was proportionally less severe in SD than LD season (21% vs. 30%, respectively) (Dal-Pan et al, 2011). Such an adaptive response may explain, herein, the lack of difference in body composition (FFM/FM ratio), even with a lower body mass in CR compared to CTL animals.

Moreover, these findings support previous results revealing higher 8OH2DG levels during the SD season in mouse lemurs subjected to an 80% CR (Giroud et al., 2009). One explanation may be that during the SD season, mouse lemurs use torpor, a daily hypothermia used as an energy saving strategy in this species (Canale et al., 2011; Terrien et al., 2009). Torpor is known equally to be costly in energy when the animals return to normothermy, leading to higher oxidative stress (Giroud et al., 2009).

Conclusion

This study highlighted new outcomes from a non-human primate model (i) a slight increase in oxidized nucleosides with age in control animals and across time, considered as « normally » aging animals; (ii) the heterogeneous effects of nutritional modulation of standard diet: CR and RSV, as oxidative stress was first generally higher and then, decreased with time when compared to control. Reduced oxidative stress may be due to different mechanisms, including a reduction of free-radical production, an increase in defences or enhanced regulation and repair processes which counteract the impact of damages. The present study does not allow us to conclude about either mechanisms but it seems that responses to CR and RSV evolve similarly within the duration of treatment, with a two step pattern: an initial short-term increase followed by a decrease of oxidative stress levels. Finally present results do not fit to the Harman's FRTA theory but more to the "hormesis" theory.

Acknowledgements

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Sandrine Chertouk for daily feeding and care provided to animals. Alexandre Zahariev, Isabelle Chery and Eric Gueton are recognised for expert technical assistance. This work was carried out with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research. We thank the RESTRIKAL Consortium: Fabienne Aujard, Roger Botalla, Alexandre Dal-Pan, Eric Gueton, Isabelle Hardy, Laurine Haro, Julia Marchal, Fabien Pifferi, Martine Perret, Jérémy Terrien, Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Centre National de la Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle, France; Stéphane Blanc, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, France; Jacques Epelbaum, Philippe Zizzari, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, France; Jean-Luc Picq, Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, France. This study was conducted with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research.

References

- Anderson R, Prolla T. PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions. Biochim Biophys Acta. 2009; 1790(10):1059-66.

- Barger JL, Kayo T, Pugh TD, Prolla TA, Weindruch R. Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart. Exp Gerontol. 2008; 43(9):859-66.

- Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2004; 279(48):49883-8.

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006; 444(7117):337-42.

- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004; 286(5):E852-61.

- Blanc S, Colman R, Kemnitz J, Weindruch R, Baum S, Ramsey J, Schoeller D. Assessment of nutritional status in rhesus monkeys: comparison of dual-energy X-ray absorptiometry and stable isotope dilution. J Med Primatol. 2005; 34(3):130-8.

- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ, Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. Toxicol Appl Pharmacol. 2007; 222(1):122-8.

- Canale CI, Perret M, Théry M, Henry PY. Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate. J Exp Biol. 2011; 214(Pt 4):551-60.

- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. Front Pharmacol. 2012; 3:141.

- Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, Marchal J, Zahariev A, Chery I, Zizzari P, Perret M, Picq JL, Epelbaum J, Blanc S, Aujard F. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus. Age. 2011; 33(1):15-31.

- Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, Picq JL, Aujard F; RESTRIKAL Consortium. Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. PLoS One. 2011; 6(1):e16581.
- Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 287(4):L774-83.
- Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. Arch Biochem Biophys. 1996; 333(1):189-97.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res. 2004; 567(1):1-61.
- Génin F, Perret M. Photoperiod-induced changes in energy balance in grey mouse lemurs. Physiol Behav. 2000; 71(3-4):315-21.
- Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. Exp Gerontol. 2004; 39(9):1391-400.
- Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, Perret M. Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (Microcebus murinus). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 294(6):R1958-67.
- Giroud S, Perret M, Gilbert C, Zahariev A, Goudable J, Le Maho Y, Oudart H, Momken I, Aujard F, Blanc S. Dietary palmitate and linoleate oxidations, oxidative stress, and DNA damage differ according to season in mouse lemurs exposed to a chronic food deprivation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009; 297(4):R950-9.
- Terrien J, Perret M, Aujard F. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. Front Biosci. 2011; 16:1428-44.
- Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H2O2 production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. J Bioenerg Biomembr. 2001; 33(4):279-87.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Geront. 1956; 11:289.
- Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers

of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. JAMA. 2006; 295(13):1539-48.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003; 425(6954):191-6.
- Iannelli P, Zarrilli V, Varricchio E, Tramontano D, Mancini FP. The dietary antioxidant resveratrol affects redox changes of PPARalpha activity. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007; 17(4):247-56.
- Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, de Cabo R, Mattison JA. The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. Biogerontology. 2006; 7(3):143-8.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 2006; 127(6):1109-22.
- Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Merry BJ. Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria.Mech Ageing Dev. 2004; 125(8):529-38.
- Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, Devau G, Dhenain M, Dorieux O, Epelbaum J, Gomez D, Hardy I, Henry PY, Irving EA, Marchal J, Mestre-Francés N, Perret M, Picq JL, Pifferi F, Rahman A, Schenker E, Terrien J, Théry M, Verdier JM, Aujard F. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing Res Rev. 2012; 11(1):150-62.
- Lee SH, Kim I, Chung BC. Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. Clin Biochem. 2007; 40(13-14):936-8.
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(6):1768-73.
- Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. Nucleic Acids Res. 2007; 35(22):7497-504.
- Mao P, Reddy PH. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. Biochim Biophys Acta. 2011; 1812(11):1359-70.

- Marchal J, Blanc S, Epelbaum J, Aujard F, Pifferi F. Effects of chronic calorie restriction or dietary resveratrol supplementation on insulin sensitivity markers in a primate, Microcebus murinus. PLoS One. 2012; 7(3):e34289.
- Maruszak A, Gaweda-Walerych K, Sołtyszewski I, Zekanowski C. Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Acta Neurobiol Exp. 2006; 66(2):153-76.
- Masoro EJ. Influence of caloric intake on aging and on the response to stressors. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 1998; 1(3):243-57.
- Merry BJ. Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction. Aging Cell. 2004; 3(1):7-12.
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. Ecol Lett. 2009; 12(1):75-92.
- Park S, Park NY, Valacchi G, Lim Y. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. Mediators Inflamm. 2012: 984643.
- Piers LS, Soares MJ, McCormack LM, O'Dea K. Is there evidence for an age-related reduction in metabolic rate? J Appl Physiol. 1998; 85(6):2196-204.
- Pinheiro JC, Bates DM, Debroy S, Sarkar D. Nlme: linear and non linear mixed-effects models, R foundation for statistical computing. R package version 3.1-83, Vienna. 2005.
- Poljsak B, Milisav I, Lampe T, Ostan I. Reproductive benefit of oxidative damage: an oxidative stress "malevolence"? Oxid Med Cell Longev. 2011; 760978.
- Ramamoorthy M, Sykora P, Scheibye-Knudsen M, Dunn C, Kasmer C, Zhang Y, Becker KG, Croteau DL, Bohr VA. Sporadic Alzheimer disease fibroblasts display an oxidative stress phenotype. Free Radic Biol Med. 2012; 53(6):1371-1380.
- Rattan SI. Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004; 59(7):705-9.
- Redman LM, Martin CK, Williamson DA, Ravussin E. Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes. Physiol Behav. 2008; 94(5):643-8.
- Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK, de Jonge L, Williamson DA, Delany JP, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss. PLoS One. 2009; 4(2):e4377.

- Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(2):275-87.
- Rocha KK, Souza GA, Seiva FR, Ebaid GX, Novelli EL. Weekend ethanol consumption and high-sucrose diet: resveratrol effects on energy expenditure, substrate oxidation, lipid profile, oxidative stress and hepatic energy metabolism. Alcohol. 2011; 46(1):10-6.
- Rochon J, Bales CW, Ravussin E, Redman LM, Holloszy JO, Racette SB, Roberts SB, Das SK, Romashkan S, Galan KM, Hadley EC, Kraus WE; CALERIE Study Group. Design and conduct of the CALERIE study: comprehensive assessment of the long-term effects of reducing intake of energy. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66(1):97-108.
- Sharma PK, Agrawal V, Roy N. Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted Saccharomyces cerevisiae. Age. 2011; 33(2):143-54.
- Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. Mech Ageing Dev. 1994; 76(2-3):215-24.
- Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. Mol Aspects Med. 2011; 32(3):159-221.
- Voloshyna I, Hussaini SM, Reiss AB. Resveratrol in cholesterol metabolism and atherosclerosis. J Med Food. 2012; 15(9):763-73.
- Wakeling LA, Ions LJ, Ford D. Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? Age. 2009; 31(4):327-41.
- Weatherall FRS D. 2006. The use of non-human primates in research, The Weatherall report.
- Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS, Spindler SR. Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2001; 56 Spec No 1:20-33.
- Wong YT, Gruber J, Jenner AM, Ng MP, Ruan R, Tay FE. Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: protection by chronic oral intake of resveratrol. Free Radic Biol Med. 2009; 46(6):799-809.
- Wu JM, Hsieh TC, Wang Z. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. Am J Cardiovasc Dis. 2011; 1(1):38-47.
- Zuin A, Castellano-Esteve D, Ayté J, Hidalgo E. Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. Aging. 2010;2(4):231-7.

Etude 3 : Fonctions hépatiques et protocoles anti-âge : effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol chez le microcèbe

Introduction

Les données hématologiques et biochimiques du sang chez l'animal sont nécessaires pour caractériser et évaluer l'état de santé général en relation avec la qualité de l'habitat en milieu naturel ou en captivité. Ces informations peuvent être également de la plus haute importance pour dépister/diagnostiquer des maladies ou des infections de populations captives. Ainsi les marqueurs biochimiques du sang sont des outils efficaces pour détecter des perturbations induites par la captivité, par les manipulations et par les protocoles expérimentaux. Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des nutriments, des hormones et des déchets métaboliques, contribuant ainsi à l'homéostasie de l'organisme. Cet organe subit des changements importants dans sa structure et sa fonction au cours du vieillissement. Ces changements sont associés à une altération importante du métabolisme hépatique, des nombreuses activités de désintoxication et des activités enzymatiques avec des répercussions sur l'état de santé de l'organisme. Avec l'âge des modifications telles qu'une élévation du cholestérol sérique et biliaire, une baisse de la régénération des cellules hépatiques, une diminution du volume du foie et une diminution du flux sanguin ont été démontrées (Le Couteur et al., 2008). Plusieurs théories ont été proposées concernant ces modifications liées à l'âge, et l'une d'entre elles est la théorie de l'accumulation de dommages de l'ADN (Alexander, 1967) qui propose qu'une accumulation d'erreurs au niveau du matériel génétique induit une instabilité génomique dans les cellules d'un tissu, entraînant avec le temps des altérations cellulaires qui peuvent éventuellement mener à l'apoptose, à une homéostasie perturbée ou bien encore le développement de cancers.

Le but de cette étude est d'une part de valider des marqueurs biochimiques du sang, pouvant par la suite être utilisés comme marqueurs du vieillissement chez le microcèbe et permettre le diagnostic précoce de pathologies ou d'altérations de l'état de santé des animaux en captivité. D'autres part, ces marqueurs pourraient permettre l'évaluation d'effets néfastes ou au contraire bénéfiques de la RC et du RSV sur le métabolisme hépatique. Cette étude suit directement une étude menée sur une partie de la population de l'élevage de Brunoy (environ

15% de l'effectif total) pour définir les valeurs de référence des paramètres biochimiques du sang en fonction du sexe, de la saison et de l'âge des animaux (**Article 4**, **Annexe** ; Marchal et al., 2012). Ces études fournissent des valeurs références utiles pour les soins cliniques et les diagnostics de base menés chez le microcèbe en captivité ou en milieu naturel.

Matériels et méthodes

Les échantillons de sang ont été obtenus par ponction veineuse (veine saphène), puis homogénéisés dans un tube hépariné avant le dosage. Les mesures des composants biochimiques sanguins ont été effectuées en utilisant l'analyseur VetScan VS2 (© 2002, Abaxis, Inc, Union City, CA 94587 États-Unis). Un rotor spécial "VetScan ® Mammalian Liver Profil" (Abaxis, Union City, Californie) a été utilisé pour le dosage à partir d'échantillons de sang total d'environ 100µL par animal. Les concentrations des 8 métabolites suivants ont été mesurées: la concentration d'albumine (ALB), la concentration totale de bilirubine (TBIL), la concentration d'azote uréique sanguin (BUN), la concentration d'acide biliaire (BA), la concentration de cholestérol total (CHOL), la concentration d'alanine aminotransférase (ALT), la concentration de γGT (gammaglutamyl-transpeptidase ; GGT) et la concentration en phosphatase alcaline (ALP).

Les animaux ont été prélevés deux fois par an, à chaque photopériode (JC et JL). 3 groupes d'animaux ont été suivis : un groupe contrôle (CTL) de 10 animaux, un groupe de 15 animaux soumis à une restriction calorique de 30% (RC) et un groupe de 15 animaux recevant du resvératrol quotidiennement (RSV). Les prélèvements ont commencé durant la troisième année de traitement (*JC* : CTL n:4 ; RC n:7 ; RSV n:8 et *JL* : CTL n:5 ; RC n:10 ; RSV n:4) et ont été suivis en quatrième année (*JC* : CTL n:5 ; RC n:13 ; RSV n:7 et *JL* : CTL n:4 ; RC n:7 ; RSV n:5).

La distribution des données des variables d'étude a été évaluée séparément selon la saison, le traitement et l'âge avec le test de Shapiro-Wilk. La majorité des variables (métabolites sanguins) ne suivant pas une loi normale, elles ont été transformées en logarithme népérien. La médiane, les 25% et 75% quartiles et la gamme (min-max) ont été déterminées pour illustrer les données suivant les traitements. Des analyses par modèles mixtes ont été réalisées à l'aide du logiciel R, version 2.12.0 R (R Development Core Team, Vienne, Autriche) pour tester les effets fixes (traitement : RC vs CTL ; RSV vs CTL ; saison : JL vs JC et année : 4 vs 3) et l'effet aléatoire (variabilité individuelle). Un niveau de $p<0,05$ a été fixé pour les valeurs de statistique significatives.

Résultats

Le poids des animaux a significativement varié selon les traitements. Alors que le poids des animaux RSV ne diffère pas du poids des animaux CTL, les animaux RC présentent un poids plus faible, en comparaison aux animaux CTL (Figure 1).

Les protéines sanguines, l'albumine et la bilirubine (Figure 2) n'ont pas été affectées globalement par les traitements. Les taux d'albumine n'ont présenté aucune différence en fonction des saisons et de la durée de traitement. Cependant les taux de bilirubine ont présenté un effet croisé entre le traitement et la saison, indiquant des taux de bilirubine plus élevés chez les animaux restreints en période de jours longs (JL) comparé aux jours courts (JC) ($p<0,01$).

L'activité hépatique métabolique et sécrétoire est reflétée par les concentrations d'acides biliaires, d'azote uréique et de cholestérol. Alors que les concentrations d'acide biliaire diminuent entre la 3ème et la 4ème année de traitement (Figure 3), aucun effet du traitement, de la saison ou du temps n'a été mis en évidence pour les niveaux d'azote uréique. Par ailleurs, les concentrations de cholestérol varient significativement selon les traitements (diminution nette chez les animaux restreints, $p=0,01$), selon les saisons (taux plus élevés en JL qu'en JC) et au fil des années (plus élevés en 4ème année qu'en 3ème année de traitement) (Figure 4). On a également constaté un effet croisé du traitement et de la saison, avec des taux plus faibles chez les animaux RC en JL ($p<0,01$).

Enfin, l'activité enzymatique hépatique est caractérisée par les concentrations d'alanine aminotransférase, des phosphatases alcalines et des gamma-GT. Les phosphatases alcalines sont plus élevées chez les animaux supplémentés en RSV comparés aux animaux CTL, indépendamment de la saison et du temps (Figure 5). Par contre, les niveaux d'alanine aminotransférase sont plus élevés chez les animaux restreints en comparaison aux animaux CTL ($p<0,001$) et les valeurs sont également plus élevées en JL comparé aux JC indépendamment de la durée de traitement (Figure 6). Enfin les gamma-GT n'ont présenté aucune variation significative au cours de cette étude.

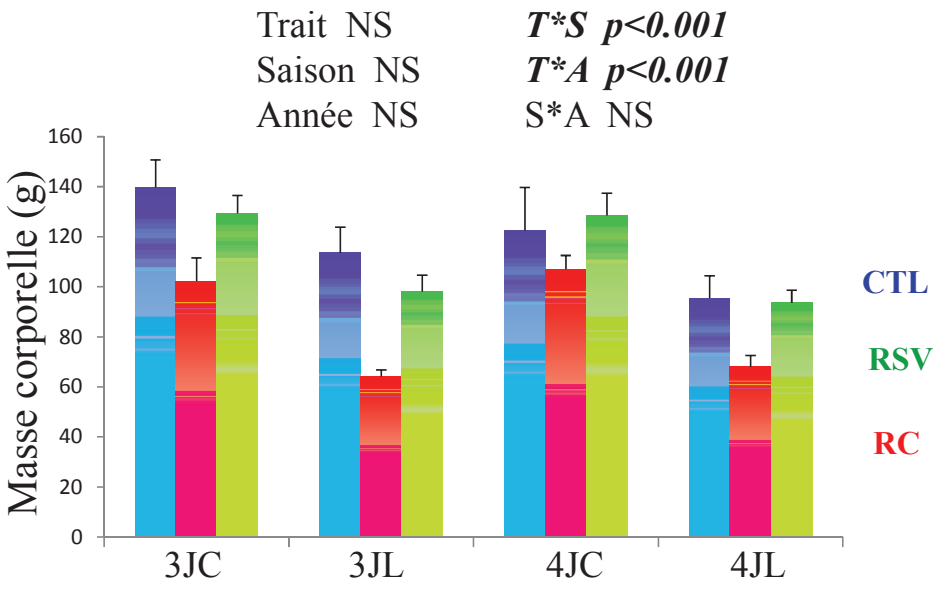


Figure 1. *Masse corporelle en fonction du traitement (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : resvératrol), de la saison (JC ou JL) et de l'année de traitement (année 3 ou année 4). Représentation des moyennes et des SEM. Significativité lorsque p<0.05. x annonce les effets croisés entre (T : traitement (Trait) ; S : saison et A : année).*

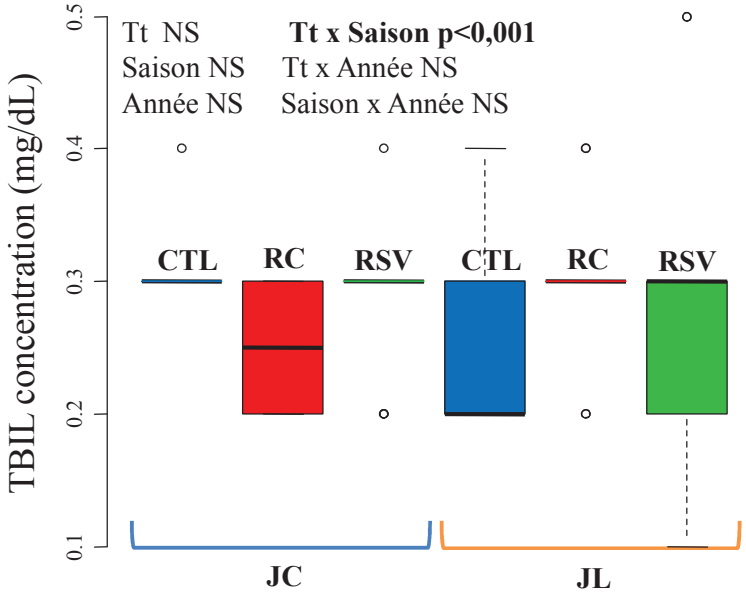


Figure 2. *Concentrations de bilirubine totale (TBIL) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC/JL). Représentation des médianes, 1er quartile et 3ème quartile. Significativité lorsque p<0.05 ; Tt : traitement ; x annonce les effets croisés).*

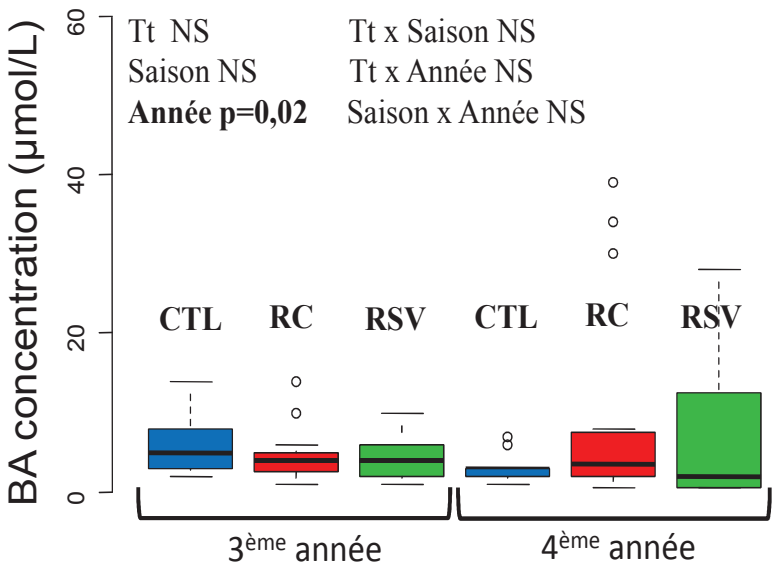


Figure 3. *Concentrations d'acide biliaire (BA) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et des années de traitement. Représentation des médianes, 1er quartile et 3ème quartile. Significativité lorsque p<0.05 ; Tt : traitement ; x annonce les effets croisés).*

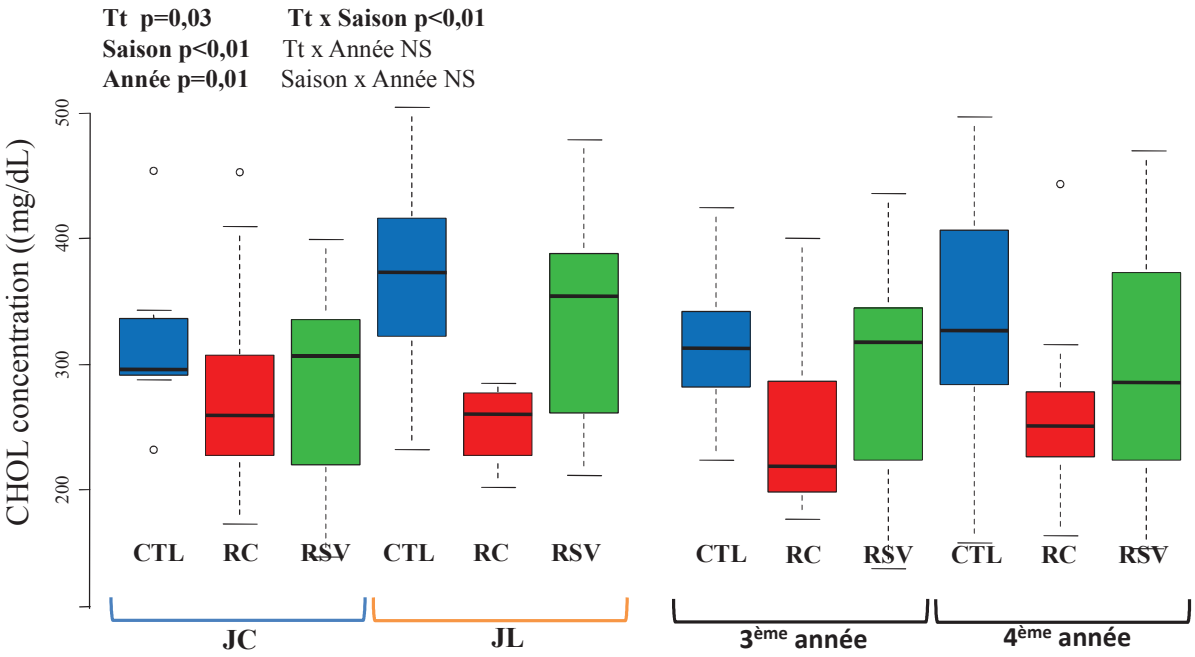


Figure 4. *Concentrations de cholestérol total (CHOL) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol), de la saison*

(JC/JL et de l'année de traitement). Représentation des médianes, 1er quartile et 3ème quartile. Significativité lorsque p<0.05 ; Tt : traitement ; x annonce les effets croisés).

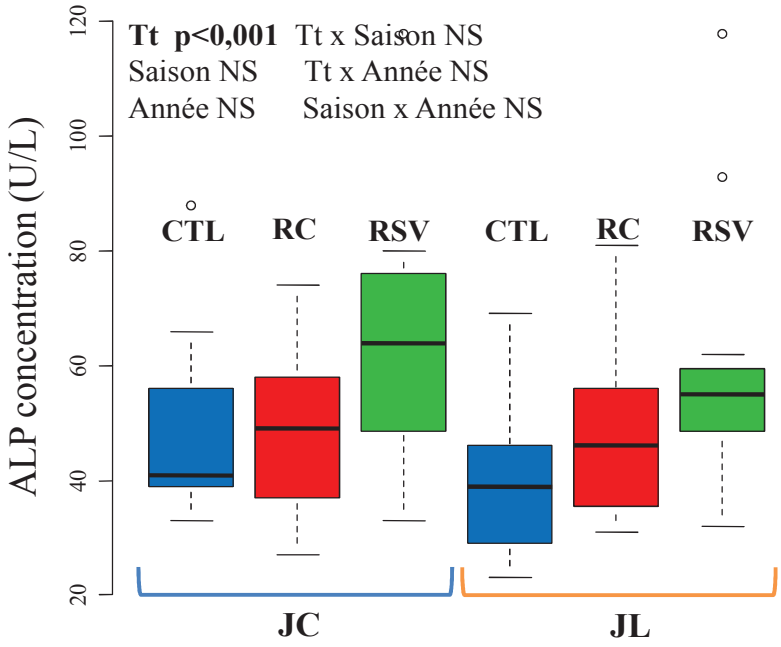


Figure 5. *Concentrations en phosphatase alcaline (ALP) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC ou JL). Représentation des médianes, 1er quartile et 3ème quartile. Significativité lorsque p<0.05 ; Tt : traitement ; x annonce les effets croisés).*

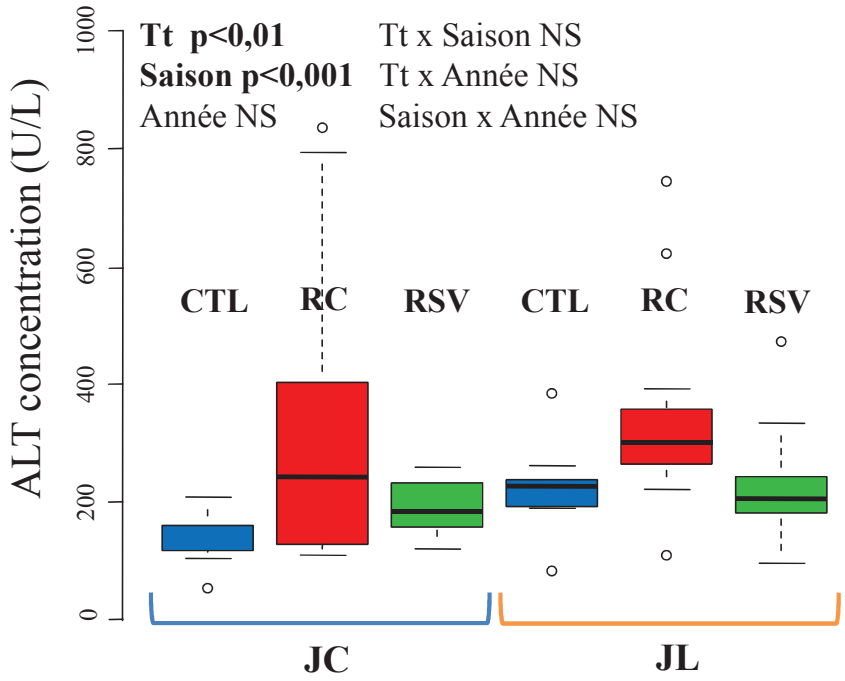


Figure 6. *Concentrations d'alanine aminotransférase (ALT) en fonction des traitements (CTL : contrôle ; RC : restriction calorique ; RSV : supplémentation en resvératrol) et de la saison (JC ou JL). Représentation des médianes, 1er quartile et 3ème quartile. Significativité lorsque p<0.05 ; Tt : traitement ; x annonce les effets croisés).*

Marqueurs biochimiques	Fonction hépatique	Restriction calorique	Resveratrol	Saison	Durée de traitement
Albumine (ALB)	Métabolisme des protéines sanguines	X	X	X	X
Bilirubine totale (TBIL)		↗ JL	X	X	X
Acides biliaires (BA)	Activités métabolique et sécrétoire	X	X	X	↘ 4ème année
Azote uréique (BUN)		X	X	X	X
Cholestérol (CHOL)		↘ JL	X	↗ JL	↗ 4ème année
Phosphatase alcaline (ALP)	Activités enzymatiques	X	↗	X	X
Alanine aminotransférase (ALT)		↗	X	↗ JL	X
Gamma-GT (ɣGT)		X	X	X	X

Tableau 1. *Résumé des principaux résultats de l'étude sur les marqueurs biochimiques du métabolisme hépatiques en fonction des traitements (CTL vs RC ou CTL vs RSV), de la saison (JC vs JL) et de l'année de traitement (3ème vs 4ème année). X : aucun effet.*

Certains microcèbes ont développé un dépôt blanc nacré et opaque au niveau des yeux (unilatéral ou bilatéral). Ces dépôts sont apparus avec le temps chez certains individus de manière plus ou moins prononcée et pouvant recouvrir jusqu'à 50% de la cornée apparente. A ce jour, 2 animaux CTL, 1 animal RC et 7 animaux RSV présentent ces symptômes. Dans la littérature, ces dépôts sont très peu décrits. Chez les animaux domestiques, et plus particulièrement chez le chat, des dépôts similaires peuvent survenir après une hyperlipémie sévère (perte de poids importante). Chez le microcèbe, au sein de l'élevage, les cas sont très rares. Les contrôles ophtalmologiques effectués régulièrement n'indiquent pas une perte de la vision chez les animaux concernés. Des analyses à partir de tissus atteints sont actuellement en cours pour déterminer la nature de ces dépôts. Vraisemblablement, il s'agirait d'une accumulation ectopique de lipides (acides gras) au niveau de la cornée et probablement à l'intérieur du globe oculaire. Les microcèbes traités de manière chronique avec du resvératrol semblent y être particulièrement sensible puisqu'environ 50% d'entre eux présentent ces caractéristiques. Le foie jouant un rôle majeur dans le métabolisme énergétique et lipidique

ainsi que dans le maintien de l'homéostasie, nous nous sommes intéressés aux relations potentielles qui pourraient exister entre la présence de tels dépôts et les concentrations sanguines en métabolites hépatiques décrits plus haut.

Des régressions logistiques binomiales ont été effectuées pour mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les variables explicatives (traitement ; poids ; métabolites hépatiques) et la présence de ces dépôts. Pour sélectionner les variables d'intérêt explicatives, la méthode StepAIC (méthode « forward » ; package MASS) a été utilisée et les modèles ont été testés grâce à la fonction glm (méthode ML (maximum likelihood) ; package MASS). Les analyses de régression logistique montrent que la présence de dépôts est corrélée à des taux faibles de cholestérol total et des taux élevés de ɣGT. Par ailleurs, la différence de poids observée au sein des animaux n'explique pas la présence de ces dépôts.

Discussion

Une restriction calorique chronique et modérée ou une supplémentation alimentaire en resvératrol ont été débutées à l'âge adulte chez des primates. L'objectif était d'évaluer l'impact de tels traitements, après trois et quatre ans de suivi longitudinal sur l'évolution des marqueurs sanguins du métabolisme hépatique. Le foie a d'importantes fonctions de réactions anaboliques et cataboliques et d'homéostasie glycémique, lipidique et protéique, en particulier de l'albumine et de la bilirubine qui sont des protéines de la coagulation sanguine. Les huit marqueurs reflètent donc à la fois le fonctionnement du foie mais ils peuvent également permettre de diagnostiquer certains types de maladies relatives au foie. Les protéines hépatiques, également pertinentes dans la recherche de perturbations rénales (Devarajan et al., 2011), n'ont pas présenté de différence avec le temps de traitement mais la bilirubine totale était plus élevée chez les RC en période de jours longs. Plusieurs études ont démontré qu'une perte de poids ou certains facteurs de stress peuvent augmenter la bilirubine totale circulante (voir pour revue, Vitek et al., 2012). Par ailleurs récemment, des niveaux élevés de bilirubine ont été associés à risque faible de développer des maladies hépatiques chez l'Homme (Chang et al., 2012). Nous avons montré que les animaux RC présentaient un poids plus faible comparé aux animaux CTL, ce qui pourrait être une des explications de l'augmentation de cette protéine sanguine particulièrement en période estivale lorsque les RC présentent une baisse importante de leur masse corporelle. Par ailleurs, plus récemment, il a également été démontré que la bilirubine pouvait agir comme un antioxydant contre les radicaux libres et que des niveaux élevés de cette protéine pourraient prévenir du développement de diabète de

type II (Cheriyath et al., 2010 ; Zelenka et al., 2012). Ces évidences nous permettent d'émettre l'hypothèse que le stress chronique induit par la RC pourrait induire une réponse adaptative, notamment par une augmentation de la bilirubine circulante pour contrer les dommages cellulaires causés par les radicaux libres au cours du temps.

Les marqueurs qui permettent d'estimer l'action sécrétoire du foie et son rôle de médiateur du métabolisme lipidique ont été partiellement affectés par les traitements. Alors que l'azote uréique n'a pas présenté d'évolution au cours de cette étude, l'acide biliaire a démontré une diminution avec l'âge, probablement du à une diminution des performances hépatiques sécrétoires avec l'avancée en âge, décrite chez les mammifères (voir pour revue Byrne et al., 2009). De plus les taux de cholestérol sont augmentés en période de jours longs et durant la 4ème année de traitement. Ces deux derniers résultats peuvent être du d'une part à l'activation du métabolisme chez les microcèbes lors de la période de LD et à une perte de poids relativement rapide qui doit engendrer des perturbations dans l'homéostasie du métabolisme lipidique et pouvant ainsi faire varier les concentrations de lipides circulant dans le sang avant un retour à l'équilibre plus tard dans la saison. Enfin le fait que les taux de cholestérol soient plus élevés au cours du temps concorde avec le fait que l'âge soit associé chez certains individus à une augmentation du cholestérol total, lié particulièrement à un manque d'activité ou a une prise alimentaire trop importante. Cependant, le résultat majeur de cette étude révèle que le taux de cholestérol total est fortement diminué chez les animaux en restriction calorique, comme cela a été observé chez des rats en restriction alimentaire (Koide et al., 2007). Cette diminution a été effective dès 3 ans de traitement et a perduré l'année suivante, que ce soit en jours longs ou en jours courts.

L'activité enzymatique hépatique, quant à elle, a été affectée par les deux traitements. Même si les ɣ-GT n'ont pas présenté de variations au cours des saisons, des traitements et du temps, le taux de phosphatases alcalines est significativement plus élevé chez les animaux RSV quelle que soit la saison ou la durée de traitement. Ceci ne concorde pas avec les résultats chez le rat montrant que l'activité de cette enzyme est diminuée en présence de resvératrol *in vitro* (Yamaguchi et Jie, 2001). Cependant une étude plus récente a montré que le resvératrol n'avait aucun effet sur les taux de phosphatases alcalines chez le mini-porc (Burgess et al., 2011) bien qu'améliorant le métabolisme glycémique hépatique. Finalement, les concentrations d'alanine aminotransférase étaient plus élevées chez les animaux RC indépendamment de la saison ou de la durée de traitement, et révèlent également une augmentation durant la période de jours longs. Chez l'Homme, une restriction en apport

glycémique n'a pas démontré de modifications dans les concentrations d'ALT plasmatiques (Browning et al., 2011), tandis qu'une restriction calorique de 6 mois chez des individus obèses entraîne une diminution de l'activité d'ALT (Larson-Meyer et al., 2008). Le fait que nos résultats ne concordent pas avec les données de la littérature peut provenir de la différence de durée de la restriction calorique, qui est à long terme (années) dans notre étude en comparaison aux études antérieures (quelques semaines/mois). Par ailleurs les deux études chez l'Homme ont été conduites sur des sujets humains obèses ou en surpoids ce qui n'est pas le cas dans notre étude. De plus, les niveaux d'ALT sont à manier avec précautions, car ils varient beaucoup d'un individu à l'autre et peuvent être trompeurs (voir pour revue Byrne et al., 2009).

En conclusion, il semble que seules les concentrations sanguines d'acide biliaire et de cholestérol aient été modifiées par l'âge montrant à la fois une activité sécrétoire hépatique atténuée avec l'âge et une cholestérolémie accrue. Cependant la RC a eu un effet très favorable en diminuant significativement les taux de cholestérol sanguins chez les animaux traités. Ce résultat conforte les résultats bénéfiques sur la régulation métabolique chez cette espèce lors d'une diminution des ressources alimentaires. Aucun effet néfaste n'a été observé, confirmant une bonne adaptation des animaux à leurs traitements respectifs. Une réserve peut-être émise quant à l'activité enzymatique (ALP et ALT) qui doit être suivie ultérieurement pour confirmer cette augmentation chez les animaux traités. Finalement, nous comptons sur les résultats de l'analyse des tissus oculaires pour tirer des conclusions quant à la nature du dépôt blanchâtre rétinien, majoritairement observé chez les animaux supplémentés en RSV.

Conclusion – Chapitre I

Ce premier chapitre avait pour premier objectif d'évaluer l'effet de l'avancée en âge sur l'apparition d'un déclin des fonctions de l'organisme et d'altérations ou de pathologies chez le microcèbe. Le deuxième objectif était d'évaluer si des interventions nutritionnelles potentiellement « anti-âge » pouvaient ralentir ou atténuer les effets de l'âge constatés chez des individus vieillissants soumis à une alimentation standard.

Dans un premier temps, les études 1 et 2 ont pu révéler que l'âge est associé à des perturbations des fonctions physiologiques chez le microcèbe lors d'un âge adulte avancé. En effet, nous avons mis en évidence une perturbation du métabolisme glycémique durant la période de jours courts avec une perturbation de l'homéostasie glycémique et insulinémique après un challenge glucosé. Nous avons également pu apporter des évidences concernant une accumulation de dommages du matériel génétique chez les animaux contrôles en période de jours courts. Ces deux études n'ont pas permis de mettre en évidence des perturbations de la composition corporelle, incluant la masse corporelle chez les animaux contrôles. La troisième étude a montré une diminution de l'activité sécrétoire hépatique avec l'âge et une augmentation des taux de cholestérol totaux également. Néanmoins, il est important de rappeler que l'ensemble des études ne couvre pas plus de 4 ans de traitement, ce qui correspond à un âge chronologique d'environ 7 ans chez les animaux du projet. Nous pouvons penser que les effets de l'âge sur les marqueurs précédemment cités se feront ressentir plus tardivement chez cette espèce qui est capable d'atteindre une durée de vie maximale exceptionnelle de 12 ans en captivité.

Dans un deuxième temps, il est clair que nous avons pu démontrer que la restriction calorique et le resvératrol ont des effets bénéfiques sur différents marqueurs du métabolisme. La restriction calorique a prouvé son action bénéfique, rapidement (dès 2 ans de traitement) en améliorant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. De même, les résultats de l'étude 2 ne révèlent pas d'accumulation significative de nucléosides oxydés chez les animaux restreints, présageant de résultats optimistes à des âges plus avancés. Enfin la RC présente un effet bénéfique concernant le métabolisme lipidique hépatique en diminuant le taux de cholestérol total circulant, quelle que soit la durée du traitement. Nous cherchions à mettre en évidence les effets mimétiques potentiels du RSV au regard des effets obtenus avec la RC. Le

RSV a ainsi présenté des effets similaires et bénéfiques quant à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, sans nécessairement affecté le taux basal d'insuline. De plus le RSV a révélé des effets « antioxydants » concernant certains marqueurs urinaires du stress oxydatif cellulaire chez le microcèbe et avec une absence de relation entre la quantité de marqueurs du stress oxydant et l'âge chronologique des animaux traités. Enfin, le RSV ne semble pas impacter le métabolisme hépatique, de manière générale, mais il est probable qu'il soit un facteur intervenant dans le métabolisme lipidique au vue des dépôts oculaires développés chez la majorité des animaux supplémentés, hypothèse que nous devrons confirmer dans le futur.

Plusieurs évidences indiquent une relation entre les perturbations métaboliques telles que la résistance à l'insuline, le diabète de type II ou l'obésité et le déclin des performances cognitives (voir pour revues Barou et al., 2008 ; Duron et Hanion, 2008). De telles perturbations homéostasiques ainsi que le stress oxydant cellulaire peuvent avoir des conséquences lourdes sur le système nerveux central : hypoxie, neuro-inflammation, diminution de la solubilité des protéines, dégénérescence et mort cellulaire, responsables des déclins cognitifs et moteur observés avec l'âge chez les vertébrés. Le chapitre suivant identifie ces déclins chez les microcèbes âgés et montrent l'impact des traitements RC et RSV sur ces perturbations.

CHAPITRE 2

Impact des protocoles anti-âge sur le vieillissement cérébral

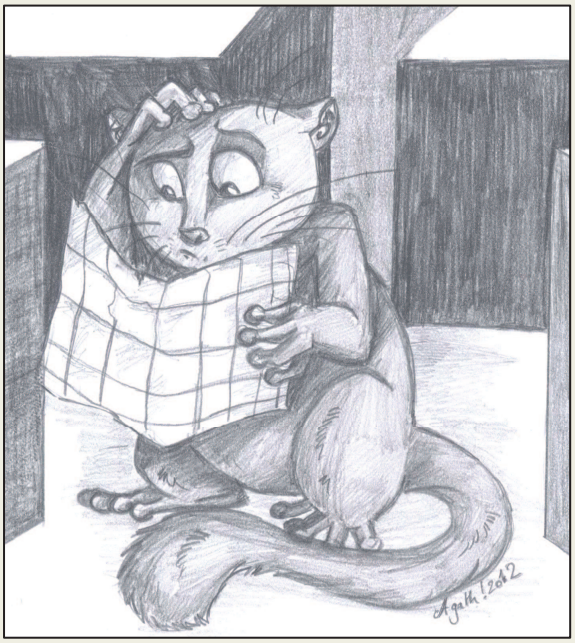
Objectifs

Etude 4 : Capacités mnésiques et comportement d'exploration chez le microcèbe : impact d'interventions anti-âge

Etude 5 : Effets d'une restriction calorique modérée ou d'une supplémentation en resvératrol sur les performances motrices et sur les traits comportementaux spontanés chez le microcèbe

Etude 6 : Atrophie cérébrale au cours de l'âge chronologique : imagerie cérébrale chez le microcèbe

Conclusion



Objectifs – Chapitre II

Ce chapitre a pour objectifs d'évaluer le déclin morpho-fonctionnel des structures cérébrales et ses conséquences au niveau des sorties comportementales. Chez les mammifères, le vieillissement normal s'accompagne d'une diminution de la vitesse de traitement des informations, d'une altération de la mémoire de travail, de la mémoire spatiale, ainsi que d'une diminution du volume des structures cérébrales et de l'intégrité de la substance blanche. Ces perturbations peuvent atteindre des degrés sévères lors du vieillissement pathologique neurodégénératif. Bien que les effets de la restriction calorique sur le retard d'apparition du déclin cognitif « normal » au cours de l'avancé en âge sont encore très controversés, les études sur le resvératrol fleurissent et démontrent son fort pouvoir antioxydant, ses propriétés neuroprotectives et anti-inflammatoires, bénéfiques au maintien des fonctions cérébrales.

Par ailleurs, la restriction calorique et le resvératrol ont tous deux révélé des effets positifs quant aux performances motrices. Concernant les études sur l'atrophie cérébrale, dans le cadre de la mise en place de protocoles anti-âge, les résultats sont encore rares et disparates prêtant parfois un effet néfaste à la restriction calorique au niveau du développement des structures cérébrales dans les phases de début de vie. Cependant l'ensemble des recherches menées dans ce domaine portent souvent sur des modèles animaux à durée de vie courte (rongeurs) auxquels des pathologies de type Alzheimer ont été induites. Nous avons donc voulu explorer les effets de tels traitements à long-terme chez un primate, le microcèbe au cours du vieillissement normal. Les résultats obtenus pouvant permettre de mieux comprendre les bases du vieillissement cérébral chez une espèce phylogénétiquement proche de l'Homme représentent de précieux atouts, particulièrement dans le cadre de la recherche de corrélats entre les paramètres physiologiques et comportementaux.

Etude 4 : Capacités mnésiques et comportement d'exploration chez le microcèbe : impact d'interventions anti-âge

Introduction

Chez l'Homme, le vieillissement est souvent associé à un déclin cognitif et à des modifications du comportement qui peuvent atteindre des degrés plus élevés chez les patients atteints de maladies neurodégénératives, comme par exemple la maladie d'Alzheimer (Farooqui et Farooqui, 2009). Des interventions susceptibles de ralentir ou d'empêcher de telles perturbations sont devenues une priorité de santé. La nutrition (et notamment l'apport énergétique) semble jouer un rôle important dans la prévention du déclin cognitif lié à l'âge (voir pour revue, Burkhalter et Hillman, 2011), précisément dans le cadre du développement de maladies neurodégénératives (voir pour revue Gu et Scarmeas, 2011). Cependant, les études des effets de la RC sur les capacités cognitives montrent des résultats très divergents, pouvant aller jusqu'à l'altération des performances à long terme (Yanai et al., 2004). Bien qu'un certain nombre de recherches chez l'animal aient mis l'accent sur les effets neuroprotecteurs du resvératrol (RSV) (Jang et Jonhson, 2010), très peu d'études ont été menées en relation avec les capacités cognitives au cours du vieillissement normal. Pourtant ce type d'étude mené à long terme chez des espèces à durée de vie moyennement longue comme le microcèbe offre des avantages indéniables dans la compréhension et la mise en évidence des mécanismes qui interviennent lors du déclin cognitif. Ces questions sont donc d'une importance majeure dans la validation et la mise en œuvre de tels protocoles à long terme chez les humains. Dans cette étude longitudinale, nous avons évalué les effets d'une RC modérée et chronique ou d'une supplémentation en RSV, initiées à l'âge adulte sur les performances mnésiques et le comportement d'exploration au cours du vieillissement chez le microcèbe.

Matériels et méthodes

Les tests d'évaluation des performances mnésiques et de l'exploration ont été réalisés sur une cohorte d'animaux séparés en trois groupes. Un groupe contrôle, un groupe soumis à une restriction calorique de 30% et un groupe supplémenté avec du resvératrol. Les tests ont été effectués une fois par an pour minimiser l'habituation des animaux aux divers dispositifs expérimentaux. Par ailleurs nous avons choisi de tester les animaux lors de la fin de leur

période « hivernal » lorsque le métabolisme s'active pour l'entrée en période « estivale ». Au cours du suivi longitudinal, les animaux étaient âgés de 2,5 à 6,5 ans (durée médiane de survie de cette espèce: 5,7 ans chez les mâles). Les animaux ont été testés, chaque année, dans quatre tâches différentes (**Annexe B**) : le test du champ ouvert (Openfield) qui permet d'évaluer l'activité d'exploration ; la tâche de préférence de place conditionnée qui évalue la mémoire associative ; la tâche de l'alternance spontanée qui teste la mémoire spatiale de travail et la tâche de la plate-forme circulaire qui teste la mémoire spatiale de référence.

Résultats

Les résultats de cette étude présentent pour la première fois l'impact d'une restriction calorique à long terme et d'une supplémentation en resvératrol sur l'activité exploratrice et les performances de la mémoire chez un primate non-humain. Les principaux résultats de cette étude longitudinale, sont (i) un impact hétérogène de l'âge puisque seule l'activité d'exploration et certaines fonctions cognitives (mémoire spatiale de référence évaluée dans la plate-forme circulaire) évoluent au cours de l'avancée en âge, (ii) la restriction calorique n'a pas montré de modifications concernant les capacités cognitives de l'âge adulte à la phase précoce de vieillissement (6,5 ans) et enfin (iii) la supplémentation en resvératrol a amélioré certains aspects de la mémoire (mémoire spatiale de travail) tout au long de la durée du traitement, mais sans améliorer les autres fonctions cognitives.

Discussion

Toutes ces évidences suggèrent que les fonctions cognitives ne sont pas affectées de manière homogène au cours du vieillissement, en ce qui concerne la période de notre étude : jusqu'à 6,5 ans. L'absence de preuve de déficits de la mémoire a pu être influencée par la simplicité des tâches et par la grande variabilité observée chez les microcèbes, observées également lors des études chez l'Homme. Par ailleurs la littérature a démontré que la mémoire spatiale est particulièrement sensible à l'âge, tandis que la mémoire de travail et la mémoire associative semblent altérées plus tardivement au cours de la vie (revue dans Grady et Craik, 2000). Les changements liés à l'âge de structures cérébrales spécifiques peuvent affecter un type de mémoire précis, telles que l'hippocampe impliqué lors de la tâche de mémoire spatiale (Picq et al., 2012). Étant donnés les effets variables et hétérogènes du vieillissement sur les différentes capacités mnésiques, les tâches utilisées dans cette étude ont permis d'évaluer l'impact de la restriction calorique et de la supplémentation en resvératrol sur des fonctions cognitives différentes. Finalement, les déficits de comportement liés à l'âge n'ont pas été

contrecarrés ni augmentés par la restriction calorique à long terme ni par l'apport chronique en resvératrol chez le microcèbe. Bien que le resvératrol n'ait eu aucun effet sur la mémoire spatiale de référence (plateforme circulaire), ce traitement a nettement amélioré, de manière sélective, la mémoire de travail (alternance spontanée). Le resvératrol pourrait donc améliorer la mémoire, de manière intrinsèque, par l'intermédiaire de multiples actions physiologiques, tels que son pouvoir antioxydant avéré, ses propriétés anti-inflammatoires et phyto-oestrogéniques. L'analyse des changements de tels paramètres physiologiques sont en cours dans la cohorte RESTRIKAL, afin d'identifier les mécanismes impliqués à la fois lors de la restriction calorique et de l'apport régulier en resvératrol.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats différents entre la RC et le RSV. Un des facteurs pourrait être des modifications de l'activité physique et des performances motrices entraînés par les différents régimes. En effet, une augmentation de l'activité physique peut par exemple donner l'apparence d'une amélioration de la fonction cognitive lors des tests cognitifs tels que la plateforme circulaire ou l'alternance spontanée qui nécessitent une activité locomotrice minimum durant la phase d'apprentissage ou d'exploration de l'environnement. Un autre facteur peut également être les modifications de l'état d'émotivité de l'animal, autrement dit son niveau d'anxiété dans un environnement nouveau ou connu. Dans la littérature, il est admis que la RC entraîne une augmentation de l'activité locomotrice spontanée ainsi qu'un maintien des performances motrices, critères à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats (Carter et al., 2009). L'étude suivante (étude 5), est dans la continuité de l'étude 4, et permettra de conclure à la fin de ce chapitre sur l'influence possible des paramètres moteurs et d'anxiété des animaux avec les capacités cognitives, au cours de l'âge.

Long-term calorie restriction or resveratrol effects on cognition in a primate

Solène Languille[1*], Julia Marchal[1*], Alexandre Dal-Pan[1], Fabien Pifferi[1], Isabelle Hardy[1], Martine Perret[1], Marc Dhenain[2], Stéphane Blanc[3], Jacques Epelbaum[4], Jean-Luc Picq[1,5], Fabienne Aujard[1], and on behalf of RESTRIKAL Consortium

[*] These authors contributed equally to this work.

[1] UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France

[2] CEA, DSV, I2BM, MIRCen, URA CEA CNRS 2210, 18 Rte du Panorama Fontenay-aux-Roses Cedex, France

[3] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[4] Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences, UMR-S 894 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

[5] Laboratoire de Psychopathologie et de Neuropsychologie, EA 2027, Université Paris 8, 2 Rue de la Liberté, St-Denis, France

Corresponding author: Fabienne Aujard, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, 1 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy, France.

E-mail: aujard@mnhn.fr

Abstract

Paradigms that may slow or prevent age-related alterations, such as the cognitive declines, have become a health priority. The only nutritional intervention known to increase longevity and to delay age-related diseases is calorie restriction (CR), but its effect on cognitive functions is still discussed. Resveratrol, a potential mimetic of the beneficial effect of CR, may avoid CR energetic constraints while preventing brain aging. In this longitudinal study, we assessed the effects of a -30% calorie restriction or a 200mg.kg^{-1}.day^{-1} resveratrol intake, initiated at adult age on exploratory behavior and on simple associative, working and spatial reference memories through aging of a non-human primate, the grey mouse lemur. Results revealed that exploratory activity and spatial memory were affected across aging. CR did not alter nor modulate cognitive abilities from adult to old age contrary to what has been previously demonstrated in rodents and RSV supplementation enhanced the working memory (assessed in the spontaneous alternation test) all along the duration of the treatment.

Keywords: exploration, working memory, spatial memory, aging, grey mouse lemur

1. Introduction

In humans, aging is often associated with cognitive decline and a number of behavioral changes that can reach higher deficits in neurodegenerative diseases patients, such as Alzheimer's disease patients. As the aging population, the life expectancy and the worldwide prevalence of neurodegenerative diseases are increasing (Ferri et al., 2005), interventions that may slow or prevent such alterations have become a health priority. There are several evidences indicating that nutrition may play an important role in the prevention of age-related cognitive declines. Although positive associations have been shown between a number of nutrients and cognitive performances, energy intake seems to play a key role in brain aging (see for review, Burkhalter and Hillman, 2011). On the other hand, there is considerable evidence from rodent studies and emerging evidence from human studies that sustained excessive energy intake can adversely affect cognitive functions.

Calorie restriction (CR) is now considered as the only non-genetic manipulation which can delay the onset of age-related diseases and increase longevity in several animal species. However, studies on the effect of CR on cognitive skills are divergent, and mechanistic purpose underlying these effects is still unclear. While a long-term calorie restriction enabled enhancement of cognitive performances (Pitsikas et al., 1990; Fontán-Lozano et al., 2007; Adams et al., 2008), some studies showed that CR fails to retard cognitive aging in rats (Beatty et al., 1987; Means et al., 1993; Bellush et al., 1996; Markowska et al., 1999). Moreover, Yanai et al. reported that a long-term CR resulted in worsened performance of old rats (Yanai et al., 2004). The reason for these discrepancies may be related to the rather severe percentage of CR resulting in a sharp decrease of energy resources. Given these results, an alternative approach to the CR is a great need today. The development of CR mimetic, component which could mimic the beneficial effects of CR without diminishing energy resources, necessary for the proper functioning of the brain are necessary.

A natural polyphenolic compound, resveratrol (RSV) is one of the most promising candidates given its abilities to mimic the beneficial effects of CR. While a number of animal studies have focused on the neuroprotective effects of RSV via its anti-inflammatory properties, in neurodegenerative diseases such as Alzheimer (Wang et al., 2006) and Parkinson (Jin et al., 2008) diseases, there is a major lack of evidence on the effect of RSV on cognitive performances. Meanwhile, a recent study revealed a reduction in some memory deficits in old mice when supplemented with RSV (Joseph et al., 2008).

Furthermore, most studies related to the cognitive ability are often performed on models of artificial induced-cognitive deficits (including Alzheimer's and Parkinson's diseases). Additionally, experimental models use in these studies, especially rodents, often have limitations of use that does not reflect what happens in humans, including their less developed nervous system compared to humans. Because of the similarity in brain structure, non-human primates, are considered essential and relevant models for a better understanding of the cognitive deficits that occur with age. Albeit aged monkeys (*Macaca mulatta*) submitted to a chronic CR exhibited a reduction of brain atrophy (Ingram et al., 2007), no evidence supported beneficial effect of CR or RSV on age-related cognitive deficits in this species. To our knowledge, the impact of long-term calorie restriction and of resveratrol supplementation on cognitive functions has never been evaluated in a primate. These issues are of major importance in the validation and implementation of such long-term protocols in humans. In this longitudinal study, we assessed the effects of a moderate chronic CR or RSV supplementation, initiated at adult age on memory performances and exploration behavior through aging of a non-human primate, the grey mouse lemur. From 2.5 to 6.5 years (median survival time in this species: 5.7 years for males (Languille et al., 2012a)), animals were tested in four different tasks: (i) the open-field test evaluating exploratory activity, (ii) the conditioned place preference task which assesses simple associative memory ability in connecting appetitive or aversive stimuli with a particular environment, (iii) the continuous spontaneous alternation task which involves working memory, (iv) the circular platform task which requires spatial reference memory. We expected a possible effect of age on the different types of tested memory, as well as on exploration activity in aging mouse lemurs. Meanwhile we hoped for a treatment effect, regarding the chronic CR or/and RSV on the potential cognitive decline with age. Our hypothesis was that nutritional interventions could impede or improve cognitive disturbances related to age with potential mimetic effect of RSV compared to the CR.

2. Material and methods

2.1. Animals and dietary interventions

All grey mouse lemurs studied were males that were born in the laboratory breeding colony of Brunoy (UMR 7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773), carried in the RESTRIKAL study (Dal-Pan et al., 2011). Animals were housed

individually in cages (50×60×70 cm) provided with wooden branches and wooden nests, in standard and constant conditions of temperature (24–26°C) and of relative humidity (55%). In captivity, seasonal variations of physiological and behavioral functions were entrained by alternating between 6 months of a long-day photoperiod (14:10 light:dark) and 6 months of a short-day photoperiod (10:14 light:dark), under artificial light (white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Behavioral tests were performed one month before the onset of the long-day period. All tests were performed during the last 4 hours of the light phase, when animals begin their daily activity. Since vision disturbances, i.e. cataract and sclerosis of the lens, can occur with age in this species (Beltran et al., 2007), eye examinations among the three diet groups were performed by a veterinary ophthalmologist. This monitoring revealed a strong ocular pathology for one restricted animal and one animal from the control group. These disorders of vision did not seem to affect the analyzed parameters of each behavioral task.

Animals were fed fresh fruits and a daily mixture made up of ginger bread, cereals, milk and eggs (Dal-Pan et al., 2011). Water was given *ad libitum*. Originally, fifty-three animals were used in this study, randomly distributed into three different dietary groups at the age of 38±1 months: a control group (CTL) of 16 animals, a group of 19 animals submitted to calorie restriction (CR) that were fed the same diet but received 30% less than CTL and a third group of 18 animals supplemented with resveratrol (RSV) that were fed the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of resveratrol per kilogram body mass per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 5.2 $mg/kg.d^{-1}$ (Baur et al., 2006) and the 400 $mg/kg.d^{-1}$ (Lagouge et al., 2006).

In this longitudinal study, repeated measurements were performed from the initial cohort, one session per year during 4 years (see Table 1). Animals were previously examined by magnetic resonance imaging to exclude any animals presenting brain alteration or atrophy, which enable us to exclude one animal from the RSV group presenting a case of hydrocephalus. The decrease of the animal's number with time is due to mortality.

Table 1. Description of groups used for each behavioral session.

Treatment	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4
CTL	43.5±1.3 (n=16)	55.5±1.5 (n=13)	68.6±1.5 (n=11)	81.2±2.3 (n=7)
CR	43.6±0.9 (n=19)	55.5±0.9 (n=17)	67.2±1.1 (n=14)	78.7±0.9 (n=12)
RSV	42.1±0.9 (n=18)	53.8±0.9 (n=18)	65.8±0.8 (n=16)	77.0±1.0 (n=11)

Age in months of animals (mean ± SEM) and sample size for each treatment group and for each annual session.

2.2 Conditioned place preference task

The system consists of two compartments, different in shape (one rectangular and the other one triangular) and in positioned indices on the internal wall. Each chamber was lit by a red 15 W bulb and covered with a one-way mirror to allow direct observations by the experimenter. At the time of pre-test and preference test, these two compartments are connected by a third cylindrical compartment, entirely covered with one-way film allowing observations without disturbing the animal. A red 15 W bulb was placed 30 cm above the Plexiglas cylinder enabling the mouse lemur to see the outside and to be visible from the outside.

The test took place over six consecutive days and consisted of three phases: (i) pre-exposure phase, (ii) conditioning phase, (iii) test phase.

On pre-exposure phase (day 1), the animal was placed inside the cylinder and thereafter the cylinder was fixed between the two chambers. After 30 seconds, the sliding doors that blocked the ends of the cylinder were removed, allowing the animal to freely access to both chambers for a 15-min period. This exploration period started when the mouse lemur entered a chamber. Animal was considered to be in a chamber when its four paws were in it. Time spent in each of the two chambers was recorded. This phase provided the mouse lemur with some experience of both contexts and enabled the experimenter to determine which are the preferred and the non-preferred chamber for each animal. The preferred chamber was determined as the chamber in which the animal stayed the longer compared to the other chamber.

On conditioning phase (days 2–5) mouse lemurs were confined to each chamber on alternate days for a 30-min session. During the days 2 and 4, each animal was placed inside its preferred chamber. Aversive stimuli associated with this chamber were a white bright light, brief shaking and tapping of the chamber at 5th, 15th and 25th minute for 20 seconds durations. This chamber was referred to as the negative paired chamber. During the days 3 and 5, each animal was placed inside its non-preferred chamber. The rewarding stimuli associated with this chamber were a dim red light and, after 15 minutes, the introduction of the own nest-box of each animal. This chamber was referred to as the positive paired chamber.

On test phase (day 6), each mouse lemur was given free access to both chambers for a 15-min period and the time spent in each chamber was recorded, in a similar way to that used during the pre-exposure phase. Thus, we could estimate the percentage of conditioning by subtracting the percentage of time spent in the positive paired chamber by the animal on day 6 to those obtained in day 1.

2.3 Continuous spontaneous alternation task

The test was performed in a cross-shaped maze (each arm: 40×15×25 cm). The four arms (labeled A, B, C and D) ended with 90° left turns (10×15×25 cm) not visible from the centre of maze and, as a consequence, had incentive effect on mouse lemur exploratory behavior. A one-way mirror cap permitted observation by experimenter. Different signs cover the internal wall of each arm. A red 15 W bulb was placed halfway on the top of the longer wall of each arm and provided the only light in the room during testing.

At the start of the trial, the animal was placed in the maze centre and access to the four arms was prevented by removable cardboard opaque doors. After 30 seconds, the cardboard closings were removed gently, leaving the possibility for animals to explore the maze for a total of 20 minutes. The number and the sequence of visits (all four paws into a given arm) were recorded. Alternation was defined as entry into four different arms on the same overlapping sets of four consecutive choices. For example, a set consisting of arm choices C, A, B, D was considered as an alternation. The possible alternation sequences are equal to the number of arms entries minus three. The percentage of alternation is equal to the ratio of (actual alternation/possible alternation) X 100. Only data from animals that made at least 6 arm entries were included in the behavioral analyses.

2.4 Circular platform task

The apparatus consisted of a white circular platform (diameter, 100 cm) with 12 equally spaced circular holes (each 5 cm in diameter) located 3 cm from the perimeter. The platform could be rotated and was affixed 60 cm above the floor. A cardboard nest-box (10×10×20 cm) could be inserted and removed beneath each hole and served as a refuge (goal box). A black, small plywood box could be slid beneath the non-goal holes to stop the lemurs from jumping through these holes while permitting head entering. The platform was entirely surrounded with a white wall 25 cm high across its circumference and covered with a transparent Plexiglas cap that permitted the mouse lemurs to see the extra-maze visual cues. The apparatus was surrounded by a black curtain hung from a square metallic frame. The center of the frame was a one-way mirror to allow observation by the experimenter. Twenty four evenly spaced 2-W lights were affixed beneath the one-way mirror and following the circular perimeter of the maze (50 cm above the platform) to illuminate the maze. The center of the maze was also illuminated with a 60-W light. Between the one-way mirror and the upper edge of the wall, various objects were attached along the inner surface of the curtain to serve as visual cues. The starting box was an open-ended dark cylinder positioned in the center of the platform. Transparent radial Plexiglas partitions were placed between the holes to prevent the strategy used by some mouse lemurs to go directly to the periphery of the platform, then walk along the barrier wall and inspect each hole one by one. Consequently, animals had to return to the center of the platform after each hole inspection.

Animals were given one day of training (day 1) and one day of testing (day 2). Each day comprised four trials, each of which began with placement of the animal inside the starting box. After 30 seconds, the box was lifted to release the animal. For the lemurs, the objective was to reach the goal box positioned beneath one of the 12 holes. When the animal entered the goal box, the trial was stopped, and the animal was allowed to remain in his own nest for 1 minute. After each trial, the platform was randomly rotated on its central axis to avoid the use of intra-maze cues, although the position of the goal box was kept constant in the room.

On day 1, trials 1 and 2 consisted of placing the animal in the maze centre while only one corridor, containing only the opened goal hole, was accessible (one-choice test). For trials 3 and 4, the platform comprised six reachable corridors among which only one hole was opened (six-choice test). These two trials permitted the animal to explore the maze, observe the visual cues, and further learn the position of the goal box.

On day 2, all the 12 corridors were accessible, with only one right open hole during the four trials. Performance was assessed by the time required for the animal to reach the right exit and the number of errors prior to reaching the goal box. An error was defined as an inspection of an incorrect hole. Only data from animals that reached the goal box before 20 min of testing were included in the behavioral analyses.

2.5 Open-field test

It was consisting of bright and opaque Plexiglas wall (100×100×20 cm) and covered with a transparent Plexiglas ceiling. Four white lights of 15 W were placed at each corner of the system. The open-field session was recorded by camera and the data were analyzed after the session, which avoided the presence of an observer in the room during the test.

The mouse lemurs were placed in the open-field for free exploration for 30 min. At the end of the session, the nest-box of the mouse lemur was placed in a corner of the open-field (the same corner for all animals) to allow him to return to its nest-box with a minimal stress. We determined parameters reflecting the degree of exploratory activity for each animal: (i) latency of the first movement, (ii) total activity, and (iii) time in the centre zone. Total activity was binary scored: 0 for inactivity and 1 for activity during more than 25 sec.

2.6 Data analysis and statistics

The distribution of cognitive and anxiety variables was evaluated separately according to treatment and age. Data were analyzed with General Linear Mixed Effect Models (GLMM) fit with Laplace approximation, built with the 'lmer' function (Pinheiro and Bates, 2000) using the library "lme4" in R 2.12.1 (R Development Core Team, Vienna, Austria).

Explanatory variables were the fixed effects of treatment (Diet effect; CTL versus CR or CTL versus RSV) and of treatment duration (Time effect; Year 1 versus Year 2, Year 3 and Year 4) and all their interactions. Inter-individual variability was accounted for by declaring individual identity as random effects (between-individual variation in intercepts). Additionally number of sessions per animal may influence learning over the year, thus a correction was individually made. The final maximum-likelihood model, including only significant effects, has been achieved by deletion of the non-significant interactions and additive effects from the primary model, using ANOVA analysis to compare one model with another. The Z-tests of the significance of effects were computed with models derived from

the final model. A level of $p < 0.05$ was set for significance, and all values in text are expressed as the median and interquartile (IQ: lower quartile-upper quartile).

3. Results

3.1 Conditioned place preference task

Percentage of place conditioning was 62 % (IQ: 15-90 %) for CTL, 40 % (IQ: 0-92 %) for CR, and 52 % (IQ: 0-86 %) for RSV groups. No significant effect of treatment or time could be evidenced on percentage of conditioning in the conditioned place preference ($p>0.5$; Table 2).

3.2 Continuous spontaneous alternation task

Without exclusion criteria, neither significant effect of treatment or time was revealed for the number of visited corridors in the spontaneous alternation task. CTL animals made 7 visits (IQ: 2.25-10.75), and treated animals made 6 visits (IQ: 2-17) and 10 visits (IQ: 3-19), respectively for CR and RSV groups ($p>0.5$; data not shown).

With an exclusion criteria of a minimum of 6 visits (necessary for the analysis of percentage of alternation), no significant effect of treatment was observed, but the effect of time was significant for the number of visited corridors ($p=0.002$; Table 2 and Fig. 1A). Animals made 13 (IQ: 8.5-17), 11 (IQ: 9-17.5), 17.5 (IQ: 9.75-29.5) and 26 (IQ: 9.25-45.25) visits respectively across the four years. Indeed post-hoc analysis revealed that animals increased the estimated number of visits from the third year ($p=0.01$; Table 3) and many more at the fourth year ($p<0.001$; Table 3) independently of treatment.

Percentage of alternation of four corridors of these animals was not significantly affected by time ($p=0.07$; Table 2), but the effect of treatment was significant ($p=0.01$; Table 2 and Fig. 1B). Post-hoc analysis revealed that RSV animals expressed a higher percentage of alternation than the CTL animals (median for RSV: 17 %, IQ: 13-30 % vs median for CTL: 6 %, IQ: 0-22 %; $p=0.002$; Table 3), whereas CR animals did not differ from the CTL animals (median for CR: 13 %, IQ: 0-23.5 % vs median for CTL: 6 %, IQ: 0-22 %; $p=0.19$; Table 3).

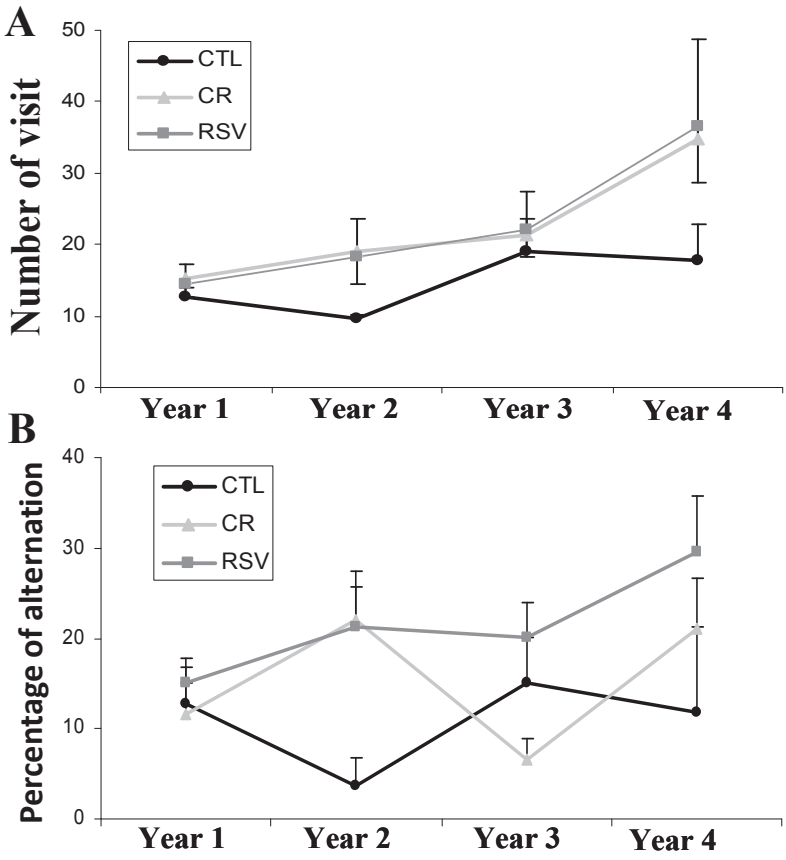


Figure 1. Estimated values of number of visit (A) and of percentage of alternation (B) during the continuous spontaneous alternation task. Representation are made for each treatment (CTL: control group; CR: restricted group and RSV: resveratrol supplemented group) through treatment duration.

3.3 Circular platform task

No significant effect of treatment or age could be evidenced on the latency to reach the goal box (Table 2).

Concerning the number of errors, analysis shows a time effect ($p=0.02$; Table 2 and Fig. 2), but no effect of treatment ($p=0.06$, Table 2). Animals made 4 (IQ: 2-6), 4 (IQ: 3-7), 5 (IQ: 3-6) and 7 (IQ: 4-8) errors respectively across the four years of the study. Post-hoc analysis revealed that estimated number of errors did not change until the third year, but increased significantly at the fourth year independently of treatment ($p<0.001$, Table 3).

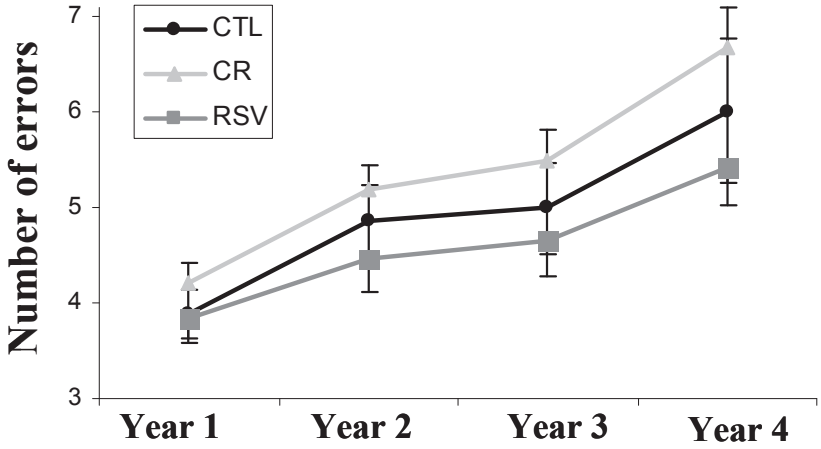


Figure 2. Estimated values of error's number before reaching the goal box in the circular patform task. Representation are made for each treatment (CTL: control group; CR: restricted group and RSV: resveratrol supplemented group) through treatment duration.

3.4 Open-field test

Parameters considered in the open-field did not vary with treatment (Table 2). Whereas duration in the centre zone was not modify across time, time effect was strongly evidenced on the latency of the first movement ($p<0.001$; Table 2 and Fig. 3A) and on the total activity during the 30-min session ($p=0.04$; Table 2 and Fig. 3B). Post-hoc analyses of the binary scoring show that in the fourth year, activity increased significantly in comparison with the first year ($p=0.005$, Table 3). Latency of the first movement in the open-field was 370 s (IQ: 0-1800 s) during the first year, 40 s (IQ: 0-637.5 s) during the second year, 0 s (IQ: 0-52.5 s) during the third year and 0 s (IQ: 0-17.5 s) during the fourth year. Post-hoc analysis revealed that estimated latency of the first movement in the years 3 and 4 was significantly reduced compared to the first year ($p<0.001$; Table 3).

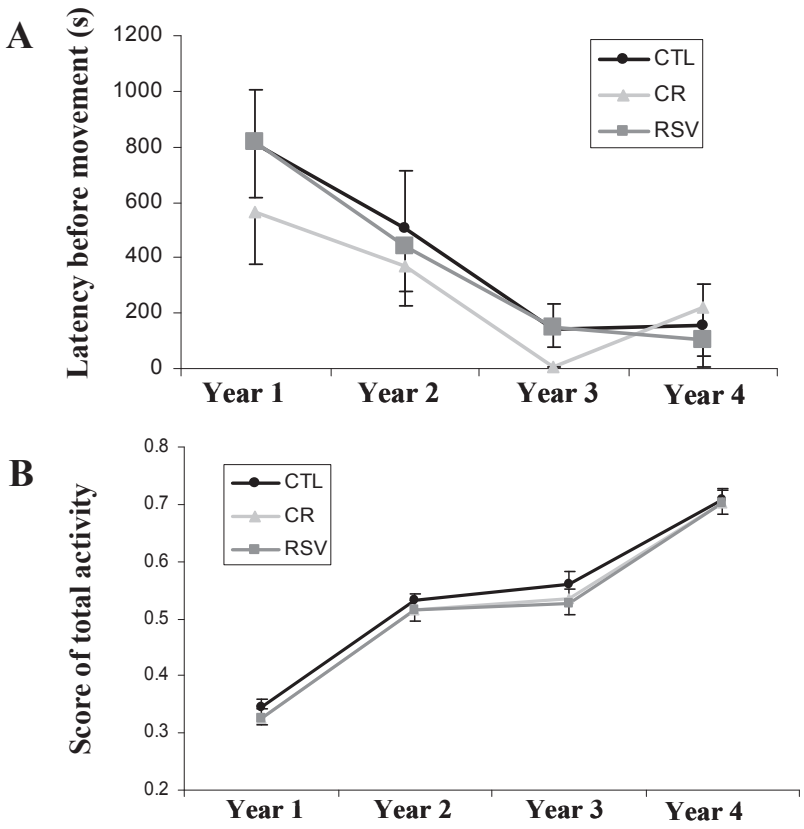


Figure 3. Estimated values of latency before the first movement and of the total activity recorded during the open-field task. Representation are made for each treatment (CTL: control group; CR: restricted group and RSV: resveratrol supplemented group) through treatment duration.

Table 2. ANOVA analysis of generalized linear mixed model of behavioral measures.

		Conditioned place		**Spontaneous alternation**				**Circular platform**				**Open-field**					
		conditioning		visits (criteria ≥ 6)		alternation		latency		errors		latency		total activity §		centre activity	
Effects	Df	Chi	P	Chi	P	Chi	P	Chi	P	Chi	P	Chi	P	Chi	P	Chi	P
Time	3	0.14	0.99	15.03	**0.002**	1.71	0.64	3.74	0.29	10.17	**0.02**	31.17	**<0.001**	8.32	**0.04**	0.55	0.91
Treatment	2	0.10	0.95	3.84	0.15	8.40	**0.01**	1.69	0.43	5.48	0.06	3.55	0.17	1.62	0.44	0.16	0.92
Time:Treatment	6	0.16	1	7.10	0.31	11.74	0.07	10.28	0.11	10.64	0.10	4.28	0.64	3.67	0.72	1.78	0.94

§ represents binary scoring.

Table 3. Parameter estimates and analysis information for the generalized linear mixed model selected from Tables 2 to predict behavioral measures.

	Spontaneous alternation				**Circular platform**		**Open-field**			
	visits (criteria ≥ 6)		alternation		errors		latency		total activity §	
Variable	Estimate	Pr > |z|	Estimate	Pr > |z|	Estimate	Pr > |z|	Estimate	Pr > |z|	Estimate	Pr > |z|
Intercept			0.95							
Treatment CR			0.77	0.13						
Treatment RSV			1.44	**0.002**						
Intercept	2.49				1.29		3.81		-0.74	
Year 2	0.05	0.70			0.20	0.16	-1.20	0.23	0.83	0.12
Year 3	0.36	**0.01**			0.25	0.09	-5.47	**<0.001**	0.90	0.09
Year 4	0.65	**<0.001**			0.54	**<0.001**	-6.56	**<0.001**	1.60	**0.005**

Intercept corresponds to the control group of the first year. § represents binary scoring.

4. Discussion

The present study highlights for the first time the impact of long-term calorie restriction and resveratrol supplementation on exploratory activity and memory performances in a non-human primate. The main results of this longitudinal study are that (i) exploratory activity and spatial memory assessed in circular platform maze were affected across aging, (ii) calorie restriction did not alter nor modulate cognitive abilities from adult to old age, (iii) resveratrol supplementation enhanced the working memory (assessed in the spontaneous alternation task) all along the duration of the treatment, without enhancing others cognitive functions.

4.1 Aging effect on exploratory activity

Modifications of both latency of first movement and activity in the open-field test exhibited a strong modulation of exploratory activity across time. Firstly, from the third year mouse lemurs waited less before moving in the open-field, than during the first year. Secondly, they travelled more during the 30-min session of the fourth year than during the first year. These results are in agreement with our previous study showing a lesser latency of first movement and a higher travelled distance in old than in adult mouse lemurs (Nemoz-Bertholet and Aujard, 2003; Languille et al., 2012b). Our observations confirmed an age-related increase of exploratory activity in an illuminated novel environment. Moreover, we also demonstrated for the first time an increase of exploratory activity in a dark environment with age, since mouse lemur made more visits in the dark cross-maze (used for spontaneous alternation task) in the third and fourth years than in the first year. This age-related increase of exploratory activity in open-field and in cross-maze could be explained by a decrease of anxiety with age.

One can argue that the time effect was not due to progressing age, but more to session effect across time. Indeed, in longitudinal studies, the first experience in a test can affect the behavioral responses in the following test and so on. However, two arguments rule out the interpretation of lack of detection related to the novelty of the open-field in our longitudinal study: (i) a recent study showed that mouse lemurs decreased their exploratory activity between two sessions of open-field test, with an inter-session interval of three and a half months (Languille et al, *submitted*). This observation suggested that mouse lemurs, which remembered the environment for at least several months, were not interested to explore a familiar environment again. Thus lack of detection of environment novelty should be

evidenced by a decrease in exploration behavior, what is inconsistent with our observations in this 4-year study; (ii) like in this longitudinal study, cross-sectional studies (Nemoz-Bertholet and Aujard, 2003; Languille et al., 2012b) demonstrated that "naïve" old mouse lemurs explore more the open-field than adult animals, suggesting that mouse lemurs detected the novelty in the open-field even if they were previously exposed once per year since their third year of life.

4.2 Aging effect on mnesic functions

Aging in mouse lemurs did not affect the performances in the conditioned place preference task, which involved long-term retention of a simple association memory. Absence of age-related deficits in this cognitive task is in accordance with previous studies in mouse lemurs showing that memory of stimulus-reward associations are preserved across aging (Joly et al., 2006; Picq 2007).

Equally, results revealed no effect of aging on the working memory performances, assessed by spontaneous alternation task. Yet, working memory deficits have been observed in a delayed discrimination task in 9-10 year old mouse lemurs (Picq, 1995) and in a three-panel runway task in 6-12 year old mouse lemurs (Trouche et al., 2010). Maintenance of spontaneous alternation in the present study could be due to a middle-age (6.5 year old) at the fourth year of testing, suggesting an appearance of working memory deficits at older age. This maintenance of high cognitive functioning (associative memory and working memory) in later life could be also due to lifelong cognitive stimulation or training and physical exercise.

In the circular platform task, however, lemurs increased the number of errors at the fourth year. This data demonstrated that spatial reference memory was impaired with age, what is consistent with the cross-sectional study of Picq et al. showing that aged mouse lemurs (6.2 to 8.4 years) expressed significantly more errors than adult (2.0 to 2.8 years) (Picq et al., 2012). Moreover, analysis of the performances within the group of aged animals showed an important variability from one subject to another: some perform well as younger animals, whereas others are profoundly impaired (Picq et al., 2012). Age-related decline of spatial abilities has been equally well-documented in rodents, non-human primates, and humans (reviewed in Klencklen et al., 2012).

All these findings suggest that cognitive functions are not affected equally across aging, until 6.5 year-old in mouse lemurs. Evidences of memory deficits were mainly influenced by the

complexity of the tasks. Spatial memory was particularly sensitive to age-related changes, whereas deficits of working memory and more of associative memory seem to appear later in life (reviewed in Grady and Craik, 2000). Age-related changes in specific brain structures may affect accurate memories, such as hippocampus for spatial memory task (Picq et al., 2012). Even if all memory tasks did not allow to show declining abilities with age, they offer the opportunity to evaluate the impact of calorie restriction and a chronic intake of resveratrol on the various cognitive skills.

4.3 Calorie restriction (CR) effect

CR did not induce modification on behavioral tasks in mouse lemurs. More specifically, age-related changes of exploratory behavior were not affected by CR, what is consistent with rodent studies (Ingram et al., 1987; Pitsikas et al., 1990). Concerning the memory processes, literature review in rodents shows contentious effects: some studies demonstrated that age-related deficits of spatial reference and working memories were counteracted by CR (Stewart et al., 1989; Pitsikas et al., 1990), some others investigations show no effect of CR on spatial memory evaluated in 8-arm radial maze (Beatty et al., 1987), in Morris water maze (Gyger et al., 1992; Means et al., 1993; Bellush et al., 1996; Markowska, 1999) and in spatial delayed matching-to-sample water-maze (Means et al., 1993). Moreover, one study revealed a deleterious effect of CR on spatial reference and working memories (Yanai et al., 2004). Duration, intensity and age at onset of CR may influence the expression of behavioral differences. Even if several studies revealed beneficial effects of an adult-started CR on many aging-biomarkers in primate (reviewed in Kemnitz, 2011), it seems that, more than CR percentage, the nature of restricted nutrients in a standard diet is more important in inducing beneficial effect, particularly in the context of neurosciences and cognitive biology (reviewed in Joseph et al., 2009). Besides, a calorie restriction of 25% investigated in human subjects for 3 or 6 months showed no improvement of cognitive abilities (Martin et al., 2007). Studies are still very scarce in humans and the results are still mitigated and discussed (for review see Matson, 2010) supporting the relevance of longitudinal studies conducted among short-lifespan non-human primates as the mouse lemur. Although our CR protocol reduced 30% of each essential nutrients compared to the standard diet without inducing malnutrition, a chronic energetic resources lowering may not enhance cognitive functions, especially by reducing the glucose upload and reserves, however known to be the essential metabolic substrate of the central nervous system. This study reveals a positive outcome as CR, when applied in long-term moderately, did not alter cognitive functions in a primate even in the

context of energy saving strategy during behavioral outcome "requesting" energy such as reproduction or complex cognitive tasks. This study may promise that CR could potentially improve selectively certain memory type in a more advanced age.

4.4 Resveratrol (RSV) effect

Although resveratrol and natural polyphenolic extracts in general, are increasingly used in human studies, notably concerning the study of their anti-oxidant and neuro-protective properties in therapy for neurodegenerative diseases (Foti Cuzzola et al., 2012), few evidences are available as regard a potential beneficial effect of RSV on cognitive skills. The study by Kennedy et al., in 2010 showed that an acute trans-RSV intake of 250 or 500 mg did not affect cognitive performances in human, although 45 minutes after ingestion, RSV induced an increase in cerebral blood flow and blood oxygenation (Kennedy et al., 2010).

In adult rodents, RSV seems to have no effect on working (Abraham and Johnson, 2009; Girbovan et al., 2011) and spatial reference memories (Gacar et al., 2011). Nevertheless, some studies demonstrated the beneficial effect of RSV on memory performances in models of neurological injuries (Gacar et al., 2011; Singleton et al., 2010), showing the neuro-protective effects of RSV on induced-memory deficits. Very few studies have investigated the effect of RSV on spontaneous age-related memory deficits. Abraham & Johnson observed no effect of a 4-week RSV supplementation on spatial working memory in old mice (Abraham and Johnson, 2009). Conversely, 12-week supplementation of RSV analog improved spatial working memory without any effect on spatial reference memory in old rats (Joseph et al., 2008). Our findings extend the previous scarce researches on RSV effects on memory and demonstrated for the first time that chronic RSV supplementation had a heterogeneous but beneficial effect on memory types, as it improves efficiently working memory all along life, from adult to old age in a primate.

The relevance of monitoring a chronic intake of RSV in our study is that we can highlight its potential mimetic effects compared to the CR treatment. Our findings discussed in previous sections provide compelling evidence to suggest that a moderate long-term CR did not alter memory skills nor did RSV either. Secondly, RSV may have a more “rapid” effect due to his pleiotropic action on numerous tissues and organs, compared to CR which may require longer time scale to modulate cognitive function through metabolic adaptive response. Similarly, the absence of a hypo-caloric state during a dietary RSV intake should probably be one of the reasons for the improvement of the spatial working memory task, compared to caloric

restriction. Thus, in that way, RSV may mimic CR effect but the time scale permitting the complete evaluation of such a fact differs. Cognitive skills are still under longitudinally assessment in this cohort. Since cognitive abilities in old mouse lemur can be predicted by cerebral atrophy (Picq et al., 2012), magnetic resonance imaging was implemented in the Restrikal cohort to determine the impact of CR and of RSV on age-related atrophy in specific brain regions.

5. Conclusion

In conclusion, this unique longitudinal study in a primate assessed for the first time the impact of potential anti-aging interventions on cognitive functions. Age-related behavior deficits were not altered by long-term calorie restriction. Although resveratrol had no effect on age-related deficits in spatial reference memory tasks, this treatment enhanced selectively working memory. Resveratrol could enhance memory via multiple physiological actions, such as anti-oxidant, anti-inflammatory, and phyto-oestrogenic. Analysis of these physiological changes is in progress in the Restrikal cohort, as well as magnetic resonance imaging evaluation to identify mechanisms modified by both calorie restriction and resveratrol, which may explain the relative beneficial effect of resveratrol.

Acknowledgements

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Sandrine Chertouk, Lauriane Dezaire and Eric Gueton for daily feeding and care provided to the animals. Equally, Madlen Ziege, Léonie Lelli, Tristan Tissot, Nina Vinot, Adrien Lhomme-Duchadeuil, Ophélie Menant and Marie Masson are thanked and recognized for their expert technical assistance. Sabine Chahory, from the National Veterinary School of Alfort, is thanked for performing the eye examinations. This study was conducted with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research.

We thank the RESTRIKAL Consortium: Fabienne Aujard, Roger Botalla, Alexandre Dal-Pan, Eric Gueton, Isabelle Hardy, Laurine Haro, Julia Marchal, Fabien Pifferi, Martine Perret, Jérémy Terrien, Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Centre National de la

Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle, France; Stéphane Blanc, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, France; Jacques Epelbaum, Philippe Zizzari, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, France; Jean-Luc Picq, Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, France.

Disclosure statement

The co-authors declare no conflicts of interest and no financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence the present work.

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Studies were conducted through the agreement of Internal Review Board of the UMR 7179 and in accordance with the recommendations of the Weatherall report, ‘‘the use of non-human primates in research’’, special attention was paid to the welfare of animals during this work to minimize nociception.

References

- Abraham, J., Johnson, R.W., 2009. Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. Rejuvenation Res. 12, 445-453.

- Adams, M.M., Shi, L., Linville, M.C., Forbes, M.E., Long, A.B., Bennett, C., Newton, I.G., Carter, C.S., Sonntag, W.E., Riddle, D.R., Brunso-Bechtold, J.K., 2008. Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. Exp. Neurol. 211, 141-149.

- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A., 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 444, 337-342.

- Beatty, W.W., Clouse, B.A., Bierley, R.A., 1987. Effects of long-term restricted feeding on radial maze performance by aged rats. Neurobiol. Aging. 8, 325–327.

- Bellush, L.L., Wright, A.M., Walker, J.P., Kopchick, J., Colvin, R.A., 1996. Caloric restriction and spatial learning in old mice. Physiol. Behav. 60, 541–547.

- Beltran, W.A., Vanore, M., Ollivet, F., Nemoz-Bertholet, F., Aujard, F., Clerc, B., Chahory, S., 2007. Ocular findings in two colonies of grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). Vet. Ophthalmol. 10, 43-49.

- Burkhalter, T.M., Hillman, C.H., 2011. A narrative review of physical activity, nutrition, and obesity to cognition and scholastic performance across the human lifespan. Adv. Nutr. 2, 201-206.

- Dal-Pan, A., Terrien, J., Pifferi, F., Botalla, R., Hardy, I., Marchal, J., Zahariev, A., Chery, I., Zizzari, P., Perret, M., Picq, J.L., Epelbaum, J., Blanc, S., Aujard, F., 2011. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. Age (Dordr). 33, 15-31.

- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Scazufca, M., Alzheimer's Disease International. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet. 366, 2112-2117.

- Fontán-Lozano, A., Sáez-Cassanelli, J.L., Inda, M.C., de los Santos-Arteaga, M., Sierra-Domínguez, S.A., López-Lluch, G., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M., 2007. Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. J. Neurosci. 27, 10185-10195.

- Foti Cuzzola, V., Ciurleo, R., Giacoppo, S., Marino, S., Bramanti, P., 2012. Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 10, 849-862.

- Gacar, N., Mutlu, O., Utkan, T., Komsuoglu Celikyurt, I., Gocmez, S.S., Ulak, G., 2011. Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamylamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 99, 316-323.

- Girbovan, C., Morin, L., Plamondon, H., 2012. Repeated resveratrol administration confers lasting protection against neuronal damage but induces dose-related alterations of behavioral impairments after global ischemia. Behav. Pharmacol. 23, 1-13.

- Grady, C.L., Craik, F.I., 2000. Changes in memory processing with age. Curr. Opin. Neurobiol. 10, 224-231.

- Gyger, M., Kolly, D., Guigoz, Y., 1992. Aging, modulation of food intake and spatial memory: a longitudinal study. Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl. 3, 185–196.

- Ingram, D.K., Weindruch, R., Spangler, E.L., Freeman, J.R., Walford, R.L., 1987. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. J. Gerontol. 42, 78–81.

- Ingram, D.K., Young, J., Mattison, J.A., 2007. Calorie restriction in nonhuman primates: assessing effects on brain and behavioral aging. Neuroscience. 145, 1359-1364.

- Jin, F., Wu, Q., Lu, Y.F., Gong, Q.H., Shi, J.S., 2008. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. Eur. J. Pharmacol. 600, 78-82.

- Joly, M., Deputte, B., Verdier, J.M., 2006. Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, *Microcebus murinus*. Neurobiol. Aging. 27, 1045–1049.

- Joseph, J.A., Fisher, D.R., Cheng, V., Rimando, A.M., Shukitt-Hale, B., 2008. Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging. J. Agric. Food. Chem. 56, 10544-10551.

- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Willis, L.M., 2009. Grape juice, berries, and walnuts affect brain aging and behavior. J. Nutr. 139, 1813-1817.

- Kemnitz, J.W., 2011. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. ILAR. J. 52, 66-77.

- Kennedy, D.O., Wightman, E.L., Reay, J.L., Lietz, G., Okello, E.J., Wilde, A., Haskell, C.F., 2010. Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. Am. J. Clin. Nutr. 91, 1590-1597.

- Klencklen, G., Després, O., Dufour, A., 2012. What do we know about aging and spatial cognition? Reviews and perspectives. Ageing. Res. Rev. 11, 123-135.

- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 127, 1109-1122.

- Languille, S., Aujard, F., Pifferi, F., *Submitted* Effect of dietary fish oil supplementation on exploratory activity, emotional status and spatial memory in aged mouse lemur, a non-human primate.

- Languille, S., Blanc, S., Blin, O., Canale, C.I., Dal-Pan, A., Devau, G., Dhenain, M., Dorieux, O., Epelbaum, J., Gomez, D., Hardy, I., Henry, P.Y., Irving, E.A., Marchal, J., Mestre-Francés, N., Perret, M., Picq, J.L., Pifferi, F., Rahman, A., Schenker, E., Terrien, J., Théry, M., Verdier, J.M., Aujard, F., 2012a. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing. Res. Rev. 11, 150-162.

- Languille, S., Liévin-Bazin, A., Picq, J.L., Louis, C., Auffret, A., De Barry, J., Dix, S., Richardson, J.C., Schenker, E., Lestage, P., Aujard, F., 2012b. Behavioral profile across aging of a non-human primate, *Microcebus murinus*. Society For Neuroscience 42nd annual meeting.

- Martin, C.K., Anton, S.D., Han, H., York-Crowe, E., Redman, L.M., Ravussin, E., Williamson, D.A., 2007. Examination of cognitive function during six months of calorie restriction: results of a randomized controlled trial. Rejuvenation Res. 10, 179-190.

- Markowska, A.L., 1999. Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. Neurobiol. Aging. 30, 177-189.

- Mattson, M.P., 2010. The impact of dietary energy intake on cognitive aging. Front. Aging Neurosci. 2, 5.

- Means, L.W., Higging, J.L., Fernandez, T.J., 1993. Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. Physiol. Behav. 54, 503-508.

- Némoz-Bertholet, F., Aujard, F., 2003. Physical activity and balance performance as a function of age in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). Exp. Gerontol. 38, 407-414.

- Picq, J.L., 1995. Effects of aging upon recent memory in *Microcebus murinus*. Aging. 7, 17-22.

- Picq, J.L., 2007. Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. Exp. Gerontol. 42, 223-232.

- Picq, J.L., Aujard, F., Volk, A., Dhenain, M., 2012. Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. Neurobiol. Aging. 33, 1096-1109.

- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. Mixed-Effects Models in S and S-plus. Springer, Heidelberg.

- Pitsikas, N., Carli, M., Fidecka, S., Algeri, S., 1990. Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. Neurobiol. Aging. 11, 417-423.

- Singleton, R.H., Yan, H.Q., Fellows-Mayle, W., Dixon, C.E., 2010. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. J. Neurotrauma. 27, 1091-1099.

- Stewart, J., Mitchell, J., Kalant, N., 1989. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the 8-arm radial and the Morris water mazes. Neurobiol. Aging. 10, 669-675.

- Trouche, S.G., Maurice, T., Rouland, S., Verdier, J.M., Mestre-Frances, N., 2010. The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances. Neurobiol. Learn. Mem. 94, 100-106.

- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D.L., Thiyagarajan, M., Percival, S.S., Talcott, S.T., Pasinetti, G.M., 2006. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB. J. 20, 2313-2320.

- Yanai, S., Okaichi, Y., Okaichi, H., 2004. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. Neurobiol. Aging. 25, 325-332.

Etude 5 : Effets d'une restriction calorique modérée ou d'une supplémentation en resvératrol sur les performances motrices et sur les traits comportementaux spontanés chez le microcèbe

Introduction

Chez la majorité des vertébrés, le vieillissement est associé à un déclin de la fonction motrice. Pouvant être fortement dégradées lors de l'apparition de certaines maladies neurodégénératives, les performances motrices déclinent également pendant le vieillissement normal, due en partie aux changements neurochimiques et à la modification de la structure et du nombre des fibres musculaires. La perte de l'intégrité des fonctions physiques, locomotrices et d'équilibre avec l'âge représente un des premiers facteurs participant à la perte d'autonomie chez les personnes âgées, ce qui représente un problème de santé publique majeure. Certains protocoles nutritionnels, tels que la restriction calorique modérée et chronique (RC), ont montré des effets bénéfiques quand au maintien des capacités physiques et musculaires. La RC réduit la dégradation des motoneurones spinaux et augmente la transmission dopaminergique (Diao et al., 1997). Toutefois, les résultats sont encore fortement discutés et récemment, la RC n'a eu aucun effet sur les performances musculaires chez le rat âgé (Kalmar et al., 2009). Le resvératrol (RSV), composé phénolique, est l'un des candidats les plus prometteurs compte tenu de ses capacités à mimer les effets bénéfiques de la RC. Bien qu'un certain nombre d'études chez l'animal aient mis l'accent sur les effets neuroprotecteurs du RSV via ses propriétés anti-inflammatoires, les études sur le RSV dans le cadre d'application thérapeutique au cours du vieillissement normal, sont encore rares. Cependant, le RSV a montré un maintien du turn-over protéique, de la masse musculaire et de la capacité de contraction maximale chez des rats immobilisés (Momken et al., 2011). L'une des explications est entre autre, la réduction du stress oxydatif au niveau des tissus musculaire (Momken et al., 2011). Cependant, un supplémentation en RSV à long terme n'a pas diminué le développement de sarcopénie chez des souris âgées alors que le stress oxydant a été diminué (Jackson et al., 2011). À notre connaissance, l'impact d'une RC ou d'un apport alimentaire en RSV à long terme sur les traits comportementaux et la motricité (tels que les capacités physiques, l'anxiété et l'humeur) n'a jamais été évalué chez un primate. Ces questions sont pourtant d'une importance majeure dans la validation et la mise en œuvre de ces protocoles à long terme chez les humains pour l'étude du déclin moteur et des réponses

comportementales d'une part, mais aussi l'impact de tel régime sur l'anxiété et « l'humeur » des individus. Dans cette étude, nous avons évalué les effets d'une RC modérée et chronique ou d'une supplémentation en RSV, initiées à l'âge adulte sur les performances motrices, l'anxiété, l'humeur et l'activité spontanée chez le microcèbe vieillissant.

Matériels et méthodes

Les tests d'évaluation des performances motrices, de l'anxiété et des traits d'humeur ont été réalisés sur une cohorte d'animaux (**Annexe B**), âgés de 2,5 à 7,5 ans, divisée en trois groupes de traitement qui commencent à l'âge adulte (3 ans) : un groupe contrôle, un groupe soumis à une restriction calorique de 30% et un groupe supplémenté en resvératrol. Les capacités motrices : la détente verticale évaluée par le test du saut, la coordination motrice et l'endurance évaluées par le test du rotarod ont été effectués une fois par an, pendant 4 ans. Les autres tests évaluant l'équilibre, l'anxiété, et les traits d'humeur ont été réalisés après 5 ans de traitement pour compléter les observations longitudinales. La tâche d'équilibre sur tige rigide ou sur cordelette a permis d'évaluer la coordination et l'agilité, le test du plus-maze (non élevé) a permis d'évaluer l'anxiété dans un labyrinthe en croix présentant des couloirs sombres (anxiolytiques) et des couloirs éclairés (anxiogènes). Enfin, ces tâches ont été complétées par des observations directes du comportement dans la propre cage des animaux pour évaluer l'activité spontanée quotidienne et les traits d'humeur (agressivité).

Résultats

Les résultats de cette étude représentent à la fois un suivi longitudinal des performances motrices chez le microcèbe mais également l'évaluation de certaines caractéristiques comportementales sensibles à l'âge. Nous nous sommes concentrés sur l'influence potentielle des traitements sur le retard d'apparition du déclin moteur lié à l'âge, en recherchant également l'effet de tels régimes sur d'autres caractéristiques du comportement spontané du microcèbe, à savoir l'anxiété dans un environnement nouveau et les traits d'humeur. Nos résultats mettent en évidence qu'une RC modérée ou une supplémentation en RSV à long terme sont capables d'améliorer certaines performances physiques et locomotrices et l'anxiété, en modifiant par ailleurs les traits d'humeur. Les principales conclusions de cette étude sont: a) une CR chronique et modérée améliore significativement les capacités physiques, l'anxiété et l'activité locomotrice spontanée; b) la supplémentation en resvératrol induit principalement un effet « mimétique » quant aux aptitudes physiques et à

l'anxiété; c) contrairement à la RC, le RSV a entraîné une augmentation des comportements agressifs.

Discussion

Cette étude longitudinale unique chez un primate non humain, le microcèbe, a évalué pour la première fois l'impact des effets de protocoles « anti-vieillissement » sur les capacités et performances physiques et motrices, l'anxiété et l'humeur. La RC a induit des effets bénéfiques sur l'activité physique et l'anxiété, alors que la « faim » engendrée par ce régime a participé à une augmentation de l'activité locomotrice spontanée uniquement durant la période de jours longs, avant l'heure de nourrissage, sans pour autant augmenter le niveau de stress physiologique (cortisol urinaire) ou l'agressivité. Le resvératrol tend (effets non significatifs) à améliorer les performances motrices de la même manière que la RC. Par ailleurs le RSV induit une diminution de l'anxiété, comme chez les animaux restreints, avec une augmentation concomitante des comportements agressifs. De manière intéressante, le nombre de comportements agressifs était positivement corrélé au niveau de testostérone plasmatique chez les animaux supplémentés en RSV. Quelques études ont démontrés que le RSV en traitement chronique chez des rongeurs augmente la production de spermatozoïdes et la fréquence des éjaculations, faisant intervenir des mécanismes neuroendocrines de l'axe hypothalamo-hypophiso-gonadique (Juan et al., 2005). L'analyse de plusieurs marqueurs physiologiques, y compris l'équilibre énergétique sont en cours dans la cohorte RESTRIKAL, ainsi que des évaluations IRM pour identifier les mécanismes sous-jacents à la RC et au RSV, qui pourraient expliquer les similitudes mais également les différences induites par ces deux régimes à long terme.

Impact of long-term calorie restriction or resveratrol intake on behavioral traits in a primate: physical skills, anxiety and mood.

J. Marchal[1] *, S. Languille[1] *, Alexandre Dal-Pan[1], Fabien Pifferi[1], Isabelle Hardy[1], Martine Perret[1], Marc Dhenain[2], Stéphane Blanc[3], Jacques Epelbaum[4], Jean-Luc Picq[1,5], Fabienne Aujard[1], on behalf of RESTRIKAL Consortium

[1] UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France

[2] CEA, DSV, I2BM, MIRCen, URA CEA CNRS 2210, 18 Rte du Panorama Fontenay-aux-Roses Cedex, France

[3] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[4] Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences, UMR-S 894 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

[5] Laboratoire de Psychopathologie et de Neuropsychologie, EA 2027, Université Paris 8, 2 Rue de la Liberté, St-Denis, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Fabienne Aujard, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, 1 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy, France.

E-mail: aujard@mnhn.fr

Abstract

In vertebrates aging is often associated with physical skills disabilities which may reach critical degree within neurodegenerative diseases development. While calorie restriction (CR) is able to reduce the age-associated loss of physical performances at least in rodents, studies have focused on an alternative approach, CR being quite tricky to apply in human especially in the elderly. Resveratrol (RSV), a natural polyphenolic compound, known for its potential CR effects mimetic, is believed to enhance or delay motor dysfunction as it presents strong antioxidant properties. However, therapeutical applications across normal aging are still poorly undergone. To our knowledge, the impact of a long-term calorie restriction and of a chronic resveratrol supplementation on behavioral traits (such as physical skills, anxiety and mood) has never been evaluated in a primate. In this study, we assessed the effects of a moderate chronic 30% CR or RSV treatment ($200mg.kg^{-1}.day^{-1}$), initiated at adult age in a non human primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) on motor performances, anxiety, mood and spontaneous activity. Muscular skills and endurance were respectively evaluated by the jump task and accelerating rotarod task, from 2.5 to 7.5 years. At 7.5 years, two tasks were implemented: light/dark plus-maze task assaying anxiety level, and aggressivity test which evaluate mood, supplemented by behavioral home-cage observations. CR induced a beneficial effect on physical abilities and anxiety, while it lead to an increase in spontaneous locomotor activity without increasing physiological stress levels or aggressiveness. Although RSV had no significant effect on physical and motor skills, this treatment decreased anxiety level as in CR animals, with a concomitant increase in aggressive behaviors. These results demonstrate the beneficial effect of such anti-aging protocol focused on motor performances and anxiety which may be associated with mood modifications in a primate.

Keywords: exploration, motor performances, aging, aggressivity, sexual hormone, grey mouse lemur

Introduction

Motor function and mood are known to be altered with age (Hebert and Gerhardt, 1998; Brown et al., 2003; Granholm et al., 2008; Kastenschmidt and Kennedy, 2011). In mammals, including humans, this age-related decline is associated with certain neurodegenerative and neurochemical changes heterogeneously expressed even in early stage of aging (Horner et al., 2011) or in normal aging population (Porter et al., 1995; Elovainio et al., 2009; Zahr et al., 2009; Chan et al., 2011). Moreover, organ-levels and mechanical properties age-related impairments are observed (Lexell and Taylor, 1991; Lexell, 1995; Hepple et al., 2004; Zahr et al., 2009) which can reach severe degrees during pathological aging through the development of neurodegenerative diseases. Such alterations may constitute the basis of motor and behavioral decline (Kolb et al., 1998; Zimmerman and Hummel, 2010; Chan et al., 2011; Pichiery et al., 2011). In humans, such alterations participate to the loss of autonomy in the elderly, representing a worldwide public health problem. Movement dysfunction is thus relevant tool to early predict and diagnose pathology development (Elovainio et al., 2009; Tsushima et al., 2009; Goble et al., 2011; Rao et al., 2011). Researchers have focused on some interventions which are known to decrease such age-related modifications (Waters et al., 2010). For example maintain physical activity reduces incapacity conditions as well as falls and fractures (McCarter et al., 1997; Gosselin et al., 2000; Buman et al., 2011). Some nutritional protocols, such as caloric restriction (CR), have been proven to be efficient to delay the motor skills decline (Burks and Cohn, 2011; Trepanowski et al., 2011). Indeed, studies have demonstrated that CR was able to reduce an age-associated loss of spinal motoneurons (Kanda, 2002) and to increase dopaminergic transmission (Diao et al., 1997), which is the major neurotransmitter implied in motor system. However results are still strongly discussed and recently CR failed to delay the age-related motor and muscular performances in rats (Kalmar et al., 2009). Given these results, an alternative approach to the CR is of great need today. The development of CR mimetic, which could mimic the beneficial effects of CR without diminishing energy resources, essential for the proper functioning of the brain are necessary. A natural polyphenolic compound, resveratrol (RSV) is one of the most promising candidates given its abilities to mimic the beneficial effects of CR. While a number of animal studies have focused on the neuroprotective effects of RSV via its anti-inflammatory properties (Singleton et al., 2010), in neurodegenerative diseases such as Alzheimer (Wang et al., 2006) and Parkinson diseases (Jin et al., 2008), studies on RSV therapeutical application across normal aging are still poorly

undergone. RSV is believed to enhance or delay motor dysfunction as they present strong antioxidant properties (Ates et al., 2006). Indeed, mitochondrial impairments have been shown to be implicated in several pathogenesis such as Huntington and Parkinson diseases. Recently post-natal administration of 25 mg of RSV have shown to improve motor function and increase lifespan in HtrA2 knockout mice which develop mitochondrial dysfunction known to induce neurodegenerative disorders (Gerhardt et al., 2011). Additionally, experimental models use in these studies, especially rodents, often have limitations of use that do not reflect what happens in humans, including their nervous system differences and their very short lifespan compared to humans. Because of the similarity in brain structure, non-human primates are considered essential and relevant models for a better understanding of the brain aging and behavioral outcomes deficits that occur with age. Albeit aged monkeys (*Macaca mulatta*) submitted to a chronic CR exhibited a reduction in the occurrence of sarcopenia (Colman et al., 2008), no evidence supported beneficial effect of CR or RSV on normal age-related motor deficits in this species. To our knowledge, the impact of long-term calorie restriction and of resveratrol supplementation on behavioral traits (such as physical skills, anxiety and mood) has never been evaluated in a primate. These issues are of major importance in the validation and implementation of such long-term protocols in humans. We expected a potential age-associated alteration as regards the different types of tested motor performances, as well as on anxiety level and mood in aging mouse lemurs, a non-human primate (median survival time in this species: 5.7 years for males (Languille et al., 2012)). Meanwhile we hoped for a treatment effect, regarding the chronic CR or/and RSV dietary intake on the potential locomotor and muscular decline with age. Our hypothesis was that nutritional interventions could enhance motor markers like jump, coordination and endurance skills related to age, with potential mimetic effect of RSV compared to the CR. Muscular skills, coordination and endurance were respectively evaluated by the jump task and accelerating rotarod task, from 2.5 to 7.5 years. At 7.5 years, two tasks were implemented: light/dark plus-maze task which assays anxiety level and aggressivity test which evaluate mood associated with behavioral home-cage observations to assess the spontaneous daily activity.

Material and methods

Animals and dietary interventions

All grey mouse lemurs studied were males that were born in the laboratory breeding colony of Brunoy (UMR 7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773), carried in the RESTRIKAL study at 38±1 months old (Dal-Pan et al., 2011). Animals were housed individually in cages (50×60×70 cm) provided with wooden branches and wooden nests, in standard and constant conditions of temperature (24–26°C) and of relative humidity (55%). In captivity, seasonal variations of physiological and behavioral functions were entrained by alternating between 6 months of a long-day photoperiod (14:10 light:dark) and 6 months of a short-day photoperiod (10:14 light:dark), under artificial light (white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Behavioral tasks were performed one month before the onset of the long-day period. All tests were performed during the last 4 hours of the light phase, when animals begin their daily activity.

Animals were fed fresh fruits and a daily mixture made up of ginger bread, cereals, milk and eggs (Dal-Pan et al., 2011). Water was given *ad libitum*. Originally, fifty-three animals were used in this study, randomly distributed into three different dietary groups at the age of 38±1 months: a control group (CTL) of 16 animals, a group of 19 animals submitted to calorie restriction (CR) that were fed the same diet but received 30% less than CTL and a third group of 18 animals supplemented with resveratrol (RSV) that were fed the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of resveratrol per kilogram of body mass per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 5.2 $mg/kg.d^{-1}$ (Baur et al., 2006) and the 400 $mg/kg.d^{-1}$ (Lagouge et al., 2006).

All these behavioral tests were performed by an observer blind to the diets, and the animals were evaluated in a random order each day. Jump and rotarod tasks were performed from the initial cohort (Table 1), one session per year during 4 years. Balance, light/dark plus-maze, and aggressivity tests were implemented on the fifth year, when animals were 7.5 years old in average.

Table 1. Description of groups used for jump and rotarod tasks session.

Treatment	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4
CTL	43.5±1.3 (n=16)	55.5±1.5 (n=13)	68.6±1.5 (n=11)	81.2±2.3 (n=7)
CR	43.6±0.9 (n=19)	55.5±0.9 (n=17)	67.2±1.1 (n=14)	78.7±0.9 (n=12)
RSV	42.1±0.9 (n=18)	53.8±0.9 (n=18)	65.8±0.8 (n=16)	77.0±1.0 (n=11)

Age in months of animals (mean ± SEM) for each treatment group and for each annual session.

Jump task

The test was performed in a closed chamber of wood (55x58x148 cm). The apparatus was affixed 30 cm above the floor. A one-way mirror covered one side of the closed chamber that permitted observations by experimenter without disturbing mouse lemurs. In the close chamber, an adjustable metal rod was installed that allowed to progressively increase the height of this rod of 10 cm between each effective test. A hatch located at the base allowed to introduce the animal in the closed chamber. To motivate the animal to jump, a 20 W bulb was placed below the system and its nest-box was installed 10 cm above the metal rod.

The animal was introduced in the closed chamber for a test of maximum 5 minutes. For the first trial, the metal rod was placed at a height of 20 cm. When the animal succeeded to rejoin its nest-box, the trial was stopped, and the animal was allowed to remain in its nest-box for 1 min. The height of the metal rod was raised by 10 cm between each successful trial. If the animal did not reach its nest-box after 5 min, the test was stopped and the animal was manually removed from the apparatus. The maximum height reached by the mouse lemur was noted. Data from animals that did not jump after 5 min were excluded of the behavioral analyses.

Accelerating rotarod task

The measurement of motor performance is addressed by using a motor-driven treadmill (a rotarod, model 7750, Ugo Basile, Italy) which consists of a 5cm dia cylinder. On

a given trial, a mouse was placed on the cylinder and the speed of rotation increased constantly (from 17 to 40 rpm) until the animal could no longer perform the running response and fell or grip on the rod during at least three consecutive turns. We recorded the time spent on the cylinder. Animals underwent 5 consecutive trials and the best result was recorded. Moreover, we quantified the number of animals that jumped from the apparatus for each trial.

Light/dark plus-maze task

The apparatus was made of plastic with four cylindrical arms that were 30-cm long and 9 cm in diameter; thus, the animals could not escape from the apparatus. The arms were arranged in a cross-like formation, with two dark opposite arms (black walls) and two light arms (transparent walls) that intersected at a central square platform (16.5x16.5 cm), which provided access to any of the four arms.

All of the floor surfaces were black, and the central platform was under homogeneous illumination at 60 W. The maze was enclosed in a four-walled chamber (66x66x41 cm) to prevent use of extra-maze cues for exploration. To avoid the presence of different odor stimuli in the two types of arms, the four arms were first saturated with a mixture of urine from other mouse lemurs. Moreover, between each test, the maze was cleaned, and the position of the types of arms was randomized.

Each mouse lemur was individually placed in the central platform via an airlock (143 cm^2). After 30 s, the doors were slowly raised, and the mouse lemur was allowed to freely explore the plus-maze for 5 min while its behavior was video-recorded. The variables recorded were the following: the latency before the first entry into the dark arms and the light arms and the number of entries (with all four paws) inside each arm. If the animal did not visit the arm, a latency of 300 s was indicated.

Home-cage observations

Direct observations in home-cage were performed at three time point of the day: i) 2 h before daily feeding, ii) 2 h after daily feeding, and iii) 1 h after light turn off (nocturnal activity). The behaviors during the last time point were evaluated under dim red light. Observations were done over a period of 1 min for each animal, during twice three consecutive days during the short-day and long-day photoperiods. We measured four movement categories: movement at the back of the cage, movement just behind the door's

cage or on the door's cage, interaction with food container, and stereotyped route (repetitions of 3 or more successive similar trajectories).

Aggressivity test

Each animal was maintained in its nestbox for the test. This test was assessed by putting a glove in front of the nestbox hole. We quantified the total number of bite and of cry made during 3 successive tests of 2 s with an inter-trial of 10 s.

Testosterone levels assay

As sexual hormone may influence both motor and mood parameters, we assayed testosterone from mouse lemurs plasma. Blood sampling for testosterone level analysis was performed three times a year, in the middle of the SD period and twice during the LD period (middle of each SD, beginning and end of each LD). Testosterone was assayed using the testosterone ELISA kit DE1559 (Demeditec, Kiel, Germany), which measures the total testosterone in plasma (expressed in ng/ml). After two distinct periods of incubation of 60 and 15 min with the different reagents, the optical density was read with a spectrophotometer at 450 nm (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA). Values were expressed in ng/ml.

Statistical analysis

Data of longitudinal tests (jump and rotarod tasks) were analyzed with General Linear Mixed Effect Models (GLMM) fit with Laplace approximation, built with the 'lmer' function (Pinheiro and Bates, 2000) using the library "lme4" in R 2.12.1 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Data from rotarod task were squared transform before analysis. Explanatory variables were the fixed effects of treatment (Diet effect; CTL versus CR or CTL versus RSV) and of treatment duration (Time effect; Year 1 versus Year 2, Year 3 and Year 4) and all their interactions. Body weight was accounted for covariate in the models for each task. Inter-individual variability was accounted for by declaring individual identity as random effects (between-individual variation in intercepts). The final maximum-likelihood model, including only significant effects, has been achieved by deletion of the non-significant

interactions and additive effects from the primary model, using ANOVA analysis to compare one model with another. The Z-tests (Chi-2) of the significance of effects were computed with models derived from the final model.

The Kruskal-Wallis test was performed, and the post-hoc analysis was done with a Mann-Whitney test to compare control group and treated groups. Wilcoxon signed rank test was used to compare parameters related to the light arms and those of the dark arms of the light/dark plus-maze task. The Fisher's exact test was used to differentiate the proportion of animals which made specific behavior during home-cage observations. A $p<0.05$ was considered significant.

Results

Jump task

The maximum height reached during the test was adjusted for body mass variations, as it is obvious that this physiological parameter interacts with mobility performances ($Chi_{8/9}$=8.88; p<0.001). Results reveal no effect of treatment ($Chi_{7/9}$=1.97; p=0.37), but a significant effect of age ($Chi_{6/9}$=16.95; p<0.001; Fig 1). Independently of treatment, the maximum height jumped decreased with advancing age from the 1st year to the 4th year of treatment (mean±SEM; CTL: 38.8±3 to 28±3.7cm; CR: 45.3±2.4 to 37±3.9cm; RSV: 40.6±2.8 to 30±4.4cm).

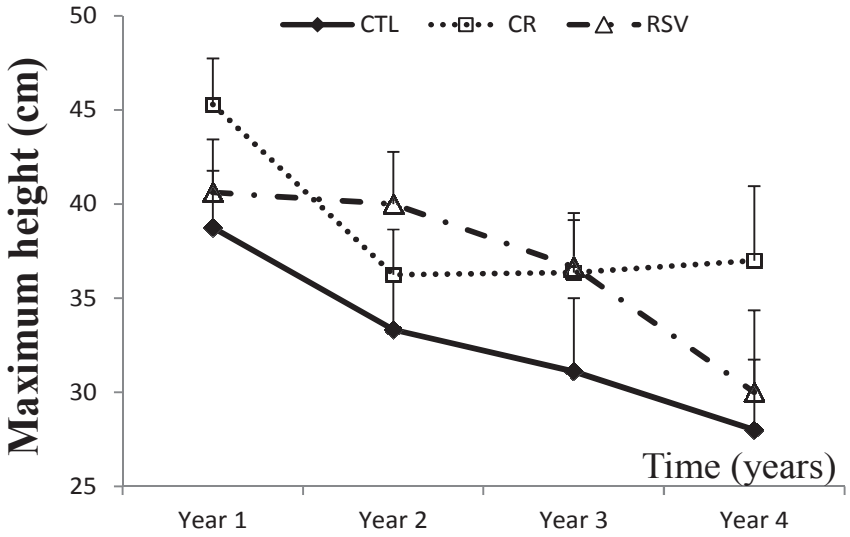


Figure 1. Effects of long-term CR and RSV diets on detente in a jump task. The maximum height (cm) was evaluated for four consecutive years from adult stage and through age in control (CTL), caloric restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) mouse lemurs. Means and SEM are represented.

Accelerating rotarod task

Body mass variations among animals has a slight effect on time spent on rotarod ($Chi_{8/9}$=3.95; p=0.046). No effect of treatment was found when considering adjusted data for body mass variations ($Chi_{7/9}$=4.11; p=0.12), nor of age ($Chi_{6/9}$=6.40; p=0.08). Considering that CR induced a rapid body mass loss, an expected issue, we performed the analysis without

body mass adjustment (Fig 2). Thus a significant effect of treatment was observed ($Chi_{6/8}$=7.63; p=0.022) but the age effect remain non significant ($Chi_{5/8}$=6.35; p=0.09). Indeed, independently of age, CR animals spent more time on the rotarod when compared to CTL animals (mean±SEM, 69.8±11.1 vs 37.9±8.1 s; p<0.01), while RSV animals showed no difference in their performances compared to CTL but tend to be generally more enduring (mean±SEM; 51.1±7.3 vs 37.9±8.1 s; p=0.09). A binomial analysis with criteria was conducted to discriminate the type of arrest: jumping from the rotarod versus falling or clinging motionless on the rotarod. Type of arrest varied significantly with treatment ($Chi_{6/8}$=9.24; p=0.01) while it did not vary significantly with age even all animals tend to jump less frequently with time from the rotarod ($Chi_{5/8}$=7.12; p=0.07). Both CR and RSV treated animals jumped more frequently than CTL ones independently of age (CR: p<0.01 and RSV: p=0.03).

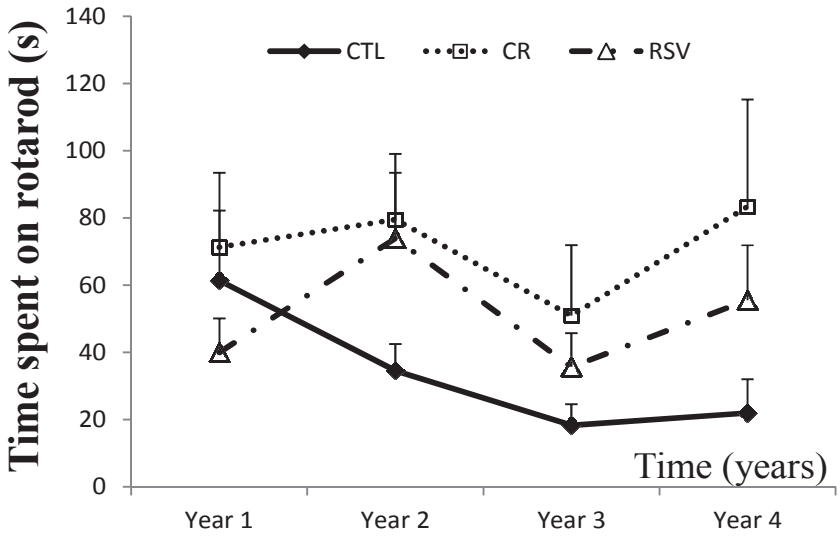


Figure 2. Effects of long-term CR and RSV diets on endurance in an accelerated rotarod task. The duration of motion on rotarod was evaluated in control (CTL), caloric restricted (CR) and resveratrol supplemented (RSV) mouse lemurs. Means and SEM are represented.

Light/dark plus-maze task

No significant differences between groups were found for each individual variable. However, animals of the CTL group took significantly less time to entry into dark arm than into light arm (V=0, p=0.031, Fig 3A). Moreover, they made significantly more visits in the

dark arms than in the light arms (V=21, p=0.031, Fig 3B). These differences were not observed in CR and RSV groups (p>0.05 for both groups).

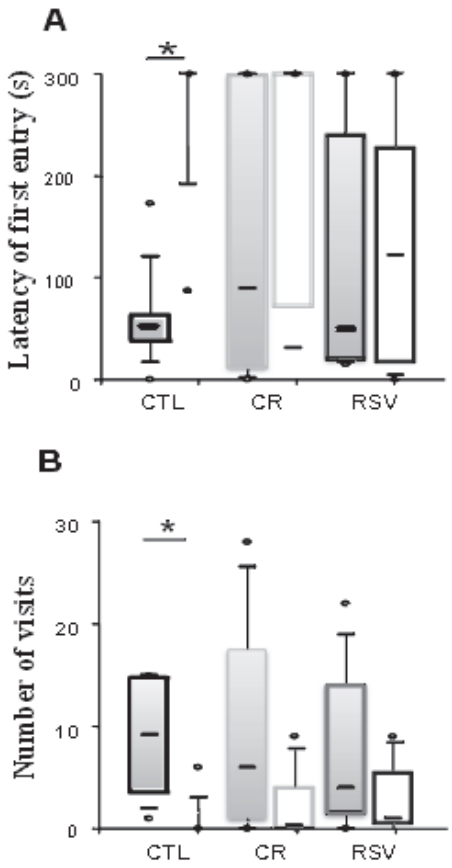


Figure 3. Effects of long-term CR and RSV diets on anxiety in a non elevated plus-maze. The latency of first entry (A) and the number of visits (B) in each type of arms "dark arms" (grey filled boxes) or "light arms" (non filled boxes) were evaluated in control (CTL, n=5), caloric restricted (CR, n=7) and resveratrol supplemented (RSV, n=7) mouse lemurs. Significant differences between dark and light arms (Mann-Whitney analyses) are indicated as * ($p < 0.05$).

Home-cage observations

Before feeding time, only some animals of the CR group made movement out of the nestbox during the long-day photoperiod (χ^2=7.66, p=0.022, Fig 4A), but not during the short-day photoperiod (Fig 4B). Whatever the photoperiod, none of the mouse lemurs made

movement out of nestbox 2h after the feeding time (data not shown). After the start of the dark phase, group differences were observed in the activity during long-day photoperiod (χ^2=13.25, p=0.0013, Fig 4C). This effect was due to the CR group exhibiting higher movement than the CTL and RSV groups (p=0.003 for both comparisons). On the other hand, no significant differences were observed during the dark phase of the short-day photoperiod (χ^2=2.55, p=0.28, Fig 4D).

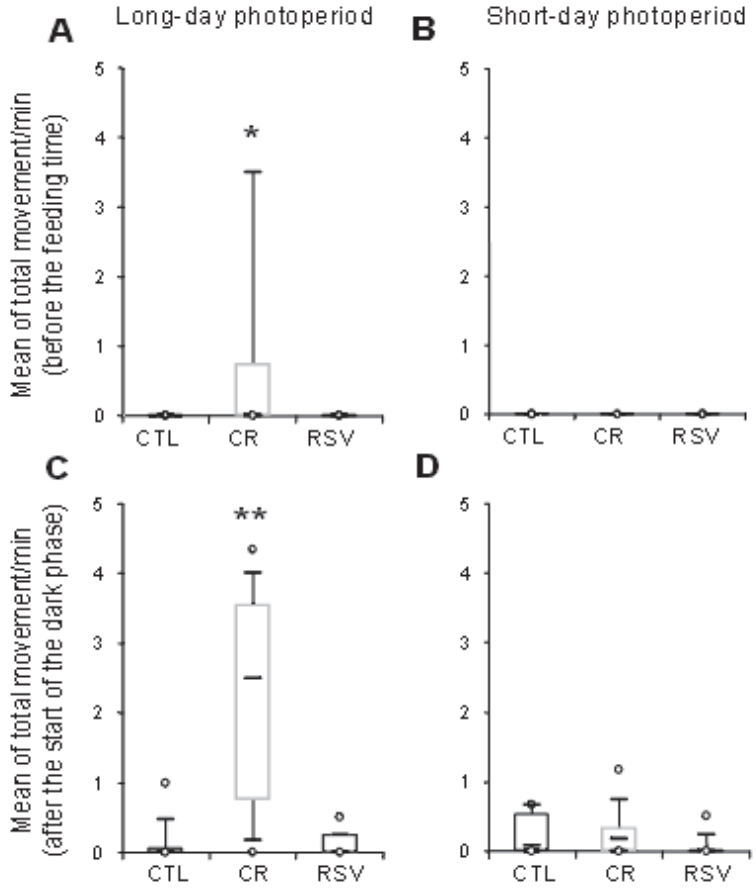


Figure 4. Effects of long-term CR and RSV diets on physical activity in home-cage during long-day and short-day photoperiods. During the long-day photoperiod, activity before feeding time (A) and after the start of the dark phase (C) was quantified in control (CTL, n=8), caloric restricted (CR, n=11) and resveratrol supplemented (RSV, n=13) mouse lemurs. During the short-day photoperiod, activity before feeding time (B) and after the start of the dark phase (D) was quantified in control (CTL, n=6), caloric restricted (CR, n=13) and resveratrol supplemented (RSV, n=12) mouse lemurs. Significant differences between the groups (Mann-Whitney analyses) are indicated as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

Whereas very few animals of the CTL or RSV group made movement closed to the door's cage, most of the CR animals expressed this behavior during long-day photoperiod (CTL vs CR: p=0.005, Table 2). Moreover, only some CR animals made contact with their food container (CTL vs CR: p=0.018). It is important to mention that only 2 among 11 animals of the CR group made stereotyped routes before feeding time during the long-day photoperiod.

Table 2. Number of animals which expressed food-related behaviors and stereotypies during the long-day (LD) and short-day (SD) photoperiod.

		Movement closed to the door's cage	Interaction with food container	Stereotypies
LD	CTL (n=8)	1	0	0
	CR (n=11)	9	6	2
	RSV (n=13)	1	0	0
SD	CTL (n=6)	1	0	0
	CR (n=13)	1	0	0
	RSV (n=12)	0	0	0

Aggressivity test and testosterone levels

Mouse lemurs from the three conditions differ significantly in aggressive behavior (χ^2=6.05, p=0.049, Fig 5). Animals of the RES group expressed more aggressive behaviors than those of the CTL and RC groups (p=0.096 and 0.022 respectively). There was no significant difference between RC and CTL groups (p=0.65). Moreover, aggressive behaviors counts were positively correlated to testosterone levels evaluated during the late SD period before animals entering the reproductive season, only in RSV animals (r=0.59, p=0.03) but no in CTL animals (r=0.31, p=0.42) nor in CR animals(r=0.08, p=0.81). Additionally one way

ANOVA revealed no effect of treatment on testosterone levels (CTL: 11.6±2.6 ng/mL; CR: 7.5±1.1 ng/mL; RSV: 19.9±6.3 ng/mL) ($dF_{2/27}$, F=2.49, p=0.1).

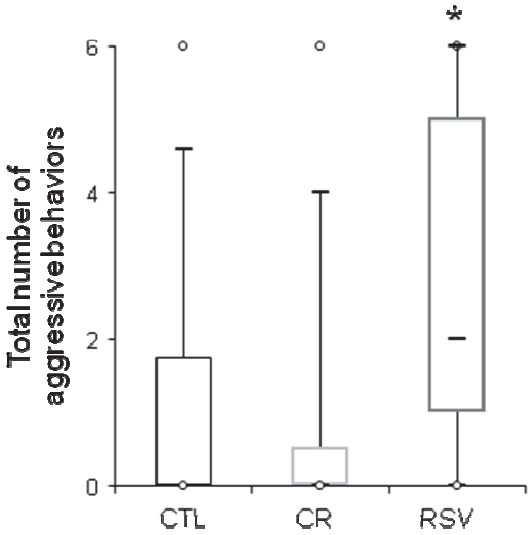


Figure 5. Effects of long-term CR and RSV diets on aggressive behaviors. The number of aggressive behaviors (cry and bite) was evaluated in control (CTL, n=8), caloric restricted (CR, n=12) and resveratrol supplemented (RSV, n=11) mouse lemurs. Significant differences between the groups (Mann-Whitney analyses) are indicated as * ($p < 0.05$).

Discussion

We investigated the effects of long-term potential "anti-aging" treatment, up to 4 consecutive years, on physical skills, anxiety and mood outcomes aging mouse lemurs. Our results evidence for the first time in a non-human primate species that moderate CR or RSV supplementation improved certain physical performances, lowered anxiety and induced modifications in mood. The main findings of this study were thus: a) a up to 4 years CR had significant effects on physical abilities, anxiety and spontaneous locomotors activity; b) the response to resveratrol supplementation mainly induced similar effect on physical skills and anxiety; c) concomitantly, supplementation with RSV resulted in changes in mood, different from those found after the CR in the mouse lemur.

Effect of a moderate long-term CR

In advanced age, there is a progressive loss of muscular and physical skills, partly due to a decrease in muscle mass, called sarcopenia and observed in several mammalian species (Cruz-Jentoft et al., 2010; Jang et Remmen, 2011). CTL animals obviously presented reduced motor skills, especially during the jump task. We demonstrated that CR mouse lemurs performed better considering time spent on rotarod, they are indeed more enduring compare to CTL animals. Long-term CR did not counteract muscular vertical jump or balance deficit observed with age in mouse lemurs. It is known that CR has a beneficial impact, inducing protective effect on muscle composition, especially on number and quality of muscular fibers in aging rodents (Aspnes et al., 1997) and in non-human primate (Colman et al., 2008). This difference in enhancing one of the two physical skills (coordination and endurance versus vertical jump) may be due to a heterogeneous effect of CR on muscle type. Indeed, it is well known that muscular fibers decrease in mass and in quality with age but with discrepancies in muscle type (Lexell and Taylor, 1991; Hepple et al., 2004). Fastest fibers are more sensible to aging than slow fibers (Luff, 1998; Lexell, 1995). In that way fastest fibers especially enrolled in fast and acute movement such as vertical jump may be particularly targeted by aging processes, even in restricted animals. In the opposite, slow muscular fibers involved in slow motion and endurance are better preserved by calorie restriction even in an advanced age. Moreover, the restricted animals showed a strong tendency to jump during the rotarod task (out of the rotarod), which shows increased activity and a greater "impulsivity" compared to control animals. CR mouse lemurs presented higher levels of spontaneous physical activity when compared to CTL animals. This is quite surprising for two reason 1) physical activity is one of the major part of the energy balance in mammals; 2) hunger induce by CR is generally attenuated as organism respond to the metabolism shift induces by CR (Martin et al., 2011). Thus under long-term CR, we expected that animals reduced their physical activity levels to conserve or limit daily energy expenditure (Redman and Ravussin, 2011). Nonetheless, our results reveal the opposite. Several researches showed that the first response to CR in mammals is generally an increase in general activity amount (Hambly and Speakman, 2005; Carter et al., 2009). One explanation may be that CR animals facing a daily decrease in their energy resources, especially in our study underwent for 4-5 years, have to succeed to maintain energy incomes, ie ingested calories, by increasing food seeking and foraging behaviors. Nevertheless, regulation of energy balance is not efficient if energy expenditure is higher than energy intake. In rodents, it is proved that CR induced first after short-term period (3 to 4 weeks) an increase in physical activity followed by a progressive decrease (Hambly and Speakman, 2005) also demonstrated in diurnal non human primates (Weed et al., 1997;

Kastman et al., 2010). An available reason may explain the compromise between increased activity and decreased resources: mouse lemurs under CR are hungry, and increase activity only in certain moment of the day, corresponding to the feeding time. Indeed, their behaviors before feeding time seem to be link to food seeking, since CR animals made more interactions with their food container and they spent more time close to the cage's door. Similarly, it is clear that mouse lemurs presented an increase in physical activity and in anticipating feeding more in LD, the active period in this species (Génin and Perret, 2000). LD is also a period during which the CR percentage may be higher, compared to the SD season as shown in previous study (Dal-Pan et al., 2011). Interestingly, only two mouse lemurs under CR expressed some kind of route stereotypies just during long-day photoperiod, showing that our CR conditions had no deleterious effect on general behavior. In rhesus monkey, it has been shown that CR induces strong behavioral disturbance in several animals, such as stereotypies (Weed et al., 1997). Finally, chronic CR reduced anxiety in mouse lemurs as CR animals have no preference to enter one type of arms rather another one, in contrary to CTL animals. Studies on potential CR effect on anxiety in mammals, including humans are very scarce and our study enriches evidences that CR, even increasing spontaneous physical activity, did not induce higher stress levels, also confirmed by no difference in their urinary cortisol levels when compared to CTL animals (Marchal et al., *in prep*).

Does RSV mimic CR effects? Similarities…and differences

The relevance of monitoring a chronic intake of resveratrol in our study is that we can highlight the potential mimetic effects of RSV compared to the CR treatment. As observed in CR animals, RSV did not modify coordination abilities on physical skills on jump task, nor on rotarod task. That said, RSV animals tend to be more enduring compared to CTL animals concerning abilities on rotarod task. Globally physical performances evolved in the same way when considering both CR and RSV treatments. While a large amount describes beneficial properties of RSV such as its anti-inflammatory and anti-oxidant properties (Chachay et al., 2011), poor evidences exist on RSV impact during normal aging in mammals and particularly in primates. RSV studies are particularly focused on anti-oxidant issues, as oxidative damages caused by reactive oxygen species accumulated with age are thought to be the major trigger in neuro-muscular diseases such as Huntington's disease and Parkinson's disease are counteracted by RSV intake (Jin et al., 2008; Gerhardt et al., 2011). However our results

concord with previous results in mouse lemurs which revealed that a 4-week RSV treatment did not affect spontaneous locomotor activity even if it decreases significantly the energy intake (ie ingested calories) (Dal-Pan et al., 2010).

Furthermore RSV mimics the CR effect on anxiety concerning the plus-maze task. These results concord with those found by Sönmez and colleagues (2007), which demonstrated that a single dose of RSV (100mg/kg body mass) decrease anxiety in rats suffering from traumatic brain injury.

Differences between CR and RSV treatments were pronounced in mood traits. While CR expressed higher food seeking behaviors in their home-cage as well as more interactions regarding their food container, RSV animals expressed more aggressive behaviors. Moreover, the aggressive outcomes were correlated with the plasmatic sexual hormone (testosterone) only in RSV animals. These findings agree with a large amount of similar evidences in birds, mammals and humans (reviewed in McCall and Singer, 2012; Chichinadze et al., 2012). Moreover, chronic resveratrol intake induced higher levels of testosterone in old rats (Juan et al., 2005); led to higher testosterone levels and higher sperm quality in rabbits fed with 50mg/kg during 28 days (Shin et al., 2008) and to spermatogenesis after testis chemical injuries in rats (Jiang et al., 2008). Testosterone levels were not different among groups in our study but aggressive behaviors were clearly more frequent in RSV animals. Paradoxically, cortisol levels were unchanged by RSV intake (Marchal et al., in press). To our knowledge, there is no evidence in the literature indicating an increase in aggressive behavior in RSV treated animals. These results on interspecific aggressivity (against the experimenter) did not match with intraspecific aggressivity observed in old mouse lemurs, as older animals exhibited more aggressive behaviors to young animals yet with lower levels of testosterone during reproductive competition (Aujard and Perret, 1998). Testosterone level seems to act differently on interspecific and intraspecific agressivity in this species.

Conclusion

In conclusion, this long-term study in a non human primate, the grey mouse lemur, assessed for the first time the impact of potential anti-aging interventions on physical skills, anxiety and mood. CR induced beneficial effect on physical activity and anxiety and lead to an increase in daily spontaneous locomotor activity without increasing physiological stress

levels or aggressiveness. Although RSV did no significantly affect physical and motor skills, supplemented animals tend to be more enduring and to perform better during the jump tasks compared to CTL animals. Similarly to CR, RSV decreased anxiety level, with no concomitant changes in physiological stress levels. However it seems that RSV animals increased their aggressive behaviors which we enabled to rely on testosterone levels; our present results did no permit us to conclude about this mood trait modification. Longitudinally analysis of physiological markers, as well as magnetic resonance imaging evaluation are currently in progress to potentially identify underlying mechanisms of both calorie restriction and resveratrol, which may explain both beneficial effect of CR and RSV mimetic effect.

Acknowledgements

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Sandrine Chertouk, Lauriane Dezaire and Eric Gueton for daily feeding and care provided to the animals. Equally, Léonie Lelli, Ophélie Menant and Tristan Tissot are thanked and recognized for their expert technical assistance. We thank the RESTRIKAL Consortium: Fabienne Aujard, Roger Botalla, Alexandre Dal-Pan, Eric Gueton, Isabelle Hardy, Laurine Haro, Julia Marchal, Fabien Pifferi, Martine Perret, Jérémy Terrien, Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Centre National de la Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle, France; Stéphane Blanc, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, France; Jacques Epelbaum, Philippe Zizzari, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, France; Jean-Luc Picq, Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, France. This study was conducted with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research.

Disclosure statement

The co-authors declare no conflicts of interest and no financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence the present work.

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Studies were conducted through the agreement of Internal Review Board of the UMR 7179 and in accordance with the recommendations of the Weatherall report, ‘‘The use of non-human primates in research’’, special attention was paid to the welfare of animals during this work to minimize nociception.

References

- Aujard F, Perret M. Age-related effects on reproductive function and sexual competition in the male prosimian primate, Microcebus murinus. Physiol Behav. 1998; 64(4):513-9.

- Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB, Aiken JM. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. FASEB J. 1997; 11(7):573-81.

- Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Kocak A, Yologlu S, Turkoz Y. Effects of resveratrol and methylprednisolone on biochemical, neurobehavioral and histopathological recovery after experimental spinal cord injury. Acta Pharmacol Sin. 2006; 27(10):1317-25.

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006; 444(7117):337-42.

- Buman MP, Giacobbi PR Jr, Dzierzewski JM, Aiken Morgan A, McCrae CS, Roberts BL, Marsiske M. Peer volunteers improve long-term maintenance of physical activity with older adults: a randomized controlled trial. J Phys Act Health. 2011; 8 Suppl 2:S257-66.

- Burks TN, Cohn RD. One size may not fit all: anti-aging therapies and sarcopenia. Aging (Albany NY). 2011; 3(12):1142-53.

- Brown AW, Marlowe KJ, Bjelke B. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. Neurobiol Aging. 2003; 24(4):607-14.

- Granholm AC, Boger H, Emborg ME. Mood, memory and movement: an age-related neurodegenerative complex? Curr Aging Sci. 2008; 1(2):133-9.

- Carter CS, Leeuwenburgh C, Daniels M, Foster TC. Influence of calorie restriction on measures of age-related cognitive decline: role of increased physical activity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009; 64(8):850-9.

- Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH. Resveratrol--pills to replace a healthy diet? Br J Clin Pharmacol. 2011; 72(1):27-38.

- Chan RC, Xu T, Li HJ, Zhao Q, Liu HH, Wang Y, Yan C, Cao XY, Wang YN, Shi YF, Dazzan P. Neurological abnormalities and neurocognitive functions in healthy elder people: a structural equation modeling analysis. Behav Brain Funct. 2011; 7:32.

- Chichinadze K, Chichinadze N, Gachechiladze L, Lazarashvili A. The role of androgens in regulating emotional state and aggressive behavior. Rev Neurosci. 2012; 23(2):123-33.

- Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Weindruch R. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008; 63(6):556-9.

- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M; European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing. 2010; 39(4):412-23.

- Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. BMC Physiol. 2010; 10:11.

- Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, Marchal J, Zahariev A, Chery I, Zizzari P, Perret M, Picq JL, Epelbaum J, Blanc S, Aujard F. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus. Age (Dordr). 2011; 33(1):15-31.

- Diao LH, Bickford PC, Stevens JO, Cline EJ, Gerhardt GA. Caloric restriction enhances evoked DA overflow in striatum and nucleus accumbens of aged Fischer 344 rats. Brain Res. 1997; 763(2):276-80.

- Elovainio M, Kivimäki M, Ferrie JE, Gimeno D, De Vogli R, Virtanen M, Vahtera J, Brunner EJ, Marmot MG, Singh-Manoux A. Physical and cognitive function in midlife: reciprocal effects? A 5-year follow-up of the Whitehall II study. J Epidemiol Community Health. 2009; 63(6):468-73.

- Génin F, Perret M. Photoperiod-induced changes in energy balance in grey mouse lemurs. Physiol Behav. 2000; 71(3-4):315-21.

- Gerhardt E, Gräber S, Szego EM, Moisoi N, Martins LM, Outeiro TF, Kermer P. Idebenone and resveratrol extend lifespan and improve motor function of HtrA2 knockout mice. PLoS One. 2011; 6(12):e28855.

- Goble DJ, Coxon JP, Van Impe A, Geurts M, Doumas M, Wenderoth N, Swinnen SP. Brain activity during ankle proprioceptive stimulation predicts balance performance in young and older adults. J Neurosci. 2011; 31(45):16344-52.

- Gosselin LE. Attenuation of force deficit after lengthening contractions in soleus muscle from trained rats. J Appl Physiol. 2000; 88(4):1254-8.

- Granholm AC, Boger H, Emborg ME. Mood, memory and movement: an age-related neurodegenerative complex? Curr Aging Sci. 2008; 1(2):133-9.

- Hambly C, Speakman JR. Contribution of different mechanisms to compensation for energy restriction in the mouse. Obes Res. 2005; 13(9):1548-57.

- Hebert MA, Gerhardt GA. Normal and drug-induced locomotor behavior in aging: comparison to evoked DA release and tissue content in Fischer 344 rats. Brain Res. 1998 Jun; 797(1):42-54.

- Hepple RT, Hagen JL, Krause DJ, Baker DJ. Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: II. Improved contractile economy in senescence helps compensate for reduced ATP-generating capacity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004; 59(11):1111-9.

- Hepple RT, Ross KD, Rempfer AB. Fiber atrophy and hypertrophy in skeletal muscles of late middle-aged Fischer 344 x Brown Norway F1-hybrid rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004; 59(2):108-17.

- Horner AM, Russ DW, Biknevicius AR. Effects of early-stage aging on locomotor dynamics and hindlimb muscle force production in the rat. J Exp Biol. 2011; 214(Pt 21):3588-95.

- Jang YC, Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. Exp Gerontol. 2011; 46(2-3):193-8.

- Jiang YG, Peng T, Luo Y, Li MC, Lin YH. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione. Chin Med J. 2008; 121(13):1204-9.

- Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. Eur J Pharmacol. 2008; 600(1-3):78-82.

- Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. J Nutr. 2005; 135(4):757-60.

- Kalmar JM, Button DC, Gardiner K, Cahill F, Gardiner PF. Caloric restriction does not offset age-associated changes in the biophysical properties of motoneurons. J Neurophysiol. 2009; 101(2):548-57.

- Kanda K. Effects of food restriction on motoneuronal loss with advancing age in the rat. Microsc Res Tech. 2002; 59(4):301-5.

- Kastenschmidt EK, Kennedy GJ. Depression and anxiety in late life: diagnostic insights and therapeutic options. Mt Sinai J Med. 2011; 78(4):527-45.

- Kastman EK, Willette AA, Coe CL, Bendlin BB, Kosmatka KJ, McLaren DG, Xu G, Canu E, Field AS, Alexander AL, Voytko ML, Beasley TM, Colman RJ, Weindruch RH, Johnson SC. A calorie-restricted diet decreases brain iron accumulation and preserves motor performance in old rhesus monkeys. J Neurosci. 2010; 30(23):7940-7.

- Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S. Age, experience and the changing brain. Neurosci Biobehav Rev. 1998; 22(2):143-59.

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 2006; 127(6):1109-22.

- Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, Devau G, Dhenain M, Dorieux O, Epelbaum J, Gomez D, Hardy I, Henry PY, Irving EA, Marchal J, Mestre-Francés N, Perret M, Picq JL, Pifferi F, Rahman A, Schenker E, Terrien J, Théry M, Verdier JM, Aujard F. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing Res Rev. 2012; 11(1):150-62.

- Lexell J, Taylor CC. Variability in muscle fibre areas in whole human quadriceps muscle: effects of increasing age. J Anat. 1991; 174:239-49.

- Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1995; 50 Spec No:11-6.

- Luff AR. Age-associated changes in the innervation of muscle fibers and changes in the mechanical properties of motor units. Ann N Y Acad Sci. 1998; 854:92-101.

- Martin CK, Das SK, Lindblad L, Racette SB, McCrory MA, Weiss EP, Delany JP, Kraus WE; CALERIE Study Team. Effect of calorie restriction on the free-living physical activity levels of nonobese humans: results of three randomized trials. J Appl Physiol. 2011; 110(4):956-63.

- McCall C, Singer T. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. Nat Neurosci. 2012; 15(5):681-8.

- McCarter RJ, Shimokawa I, Ikeno Y, Higami Y, Hubbard GB, Yu BP, McMahan CA. Physical activity as a factor in the action of dietary restriction on aging: effects in Fischer 344 rats. Aging. 1997; 9(1-2):73-9.

- Pichierri G, Wolf P, Murer K, de Bruin ED. Cognitive and cognitive-motor interventions affecting physical functioning: a systematic review. BMC Geriatr. 2011; 11:29.

- Porter MM, Vandervoort AA, Lexell J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. Scand J Med Sci Sports. 1995; 5(3):129-42.

- Rao AK, Mazzoni P, Wasserman P, Marder K. Longitudinal Change in Gait and Motor Function in Pre-manifest Huntington's Disease. PLoS Curr. 2011; 3:RRN1268.

- Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(2):275-87.

- Shin S, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB. Trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. Arch Pharm Res. 2008; 31(1):83-7.

- Singleton RH, Yan HQ, Fellows-Mayle W, Dixon CE. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2010; 27(6):1091-9.

- Sönmez U, Sönmez A, Erbil G, Tekmen I, Baykara B. Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. Neurosci Lett. 2007; 420(2):133-7.

- Trepanowski JF, Canale RE, Marshall KE, Kabir MM, Bloomer RJ. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. Nutr J. 2011; 10:107.

- Tsushima E, Hada R, Iwata M, Tsushima H. Early prediction of gait ability in patients with hip fracture. Environ Health Prev Med. 2009; 14(3):188-95.

- Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS, Talcott ST, Pasinetti GM. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J. 2006; 20(13):2313-20.

- Waters DL, Baumgartner RN, Garry PJ, Vellas B. Advantages of dietary, exercise-related, and therapeutic interventions to prevent and treat sarcopenia in adult patients: an update. Clin Interv Aging. 2010; 5:259-70.

- Weed JL, Lane MA, Roth GS, Speer DL, Ingram DK. Activity measures in rhesus monkeys on long-term calorie restriction. Physiol Behav. 1997; 62(1):97-103.

- Zahr NM, Rohlfing T, Pfefferbaum A, Sullivan EV. Problem solving, working memory, and motor correlates of association and commissural fiber bundles in normal aging: a quantitative fiber tracking study. Neuroimage. 2009; 44(3):1050-62.

- Zimerman M, Hummel FC. Non-invasive brain stimulation: enhancing motor and cognitive functions in healthy old subjects. Front Aging Neurosci. 2010; 2:149.

Etude 6 : Atrophie cérébrale au cours de l'âge chronologique : imagerie cérébrale chez le microcèbe

Introduction

Chez l'Homme, au cours du vieillissement normal et même en l'absence de neuropathologies, le volume du cerveau décroît, commençant à un rythme lent chez l'adulte jeune et accéléré chez les personnes âgées (Fotenos et al., 2005 ; Scahill et al., 2003). Le degré d'atrophie cérébrale varie considérablement entre individus (Scahill et al., 2003). Bien que l'atrophie du cerveau puisse être causée par des pathologies spécifiques, elle est souvent identifiée grâce à l'imagerie par résonnance magnétique nucléaire (IRM) chez les adultes âgés ne présentant pourtant pas de symptômes de neuropathologies. En effet l'atrophie cérébrale est l'altération morphologique la plus décrite lors du vieillissement normal (Dekaban, 1978). Une des hypothèses émises concernant la cause d'un tel déclin est la vulnérabilité croissante des tissus et cellules cérébraux face aux facteurs de stress oxydant et d'inflammation (Rosano et al., 2012), qui créent un environnement propice à la perte neuronale et à la décroissance du volume des structures cérébrales (Joseph et al., 2001). Les progrès des techniques de neuro-imagerie, couplés aux études immunohistochimiques *post-mortem,* ont grandement contribué à notre compréhension du vieillissement du système nerveux central. Ainsi, avec l'âge, les études ont pu montrer que les structures cérébrales peuvent présenter une atrophie plus ou moins importante, que la substance blanche devient moins dense et que même chez des sujets « sains » le cerveau peut présenter fréquemment des plaques de dégénérescence fibrillaire (Scahill et al., 2003 ; Joseph et al., 2009). L'impact du déclin associé à l'âge de certaines structures cérébrales sur la fonction cognitive a largement été étudié ces dernières années, et a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs revues (Raz et al., 2007 ; Park et Reuter-Lorenz., 2009 ; Reuter-Lorenz et Park, 2010). Distinguer le vieillissement cognitif sain des changements subtils caractéristiques du développement d'une neuropathologie est devenu primordial, d'autant plus que de nouvelles interventions, pharmacologiques ou nutritionnelles sont disponibles. Ainsi l'amélioration de nos capacités à identifier de manière précoce une pathologie peut avoir un impact important sur la mise en place d'éventuels traitements neuroprotecteurs, même chez des sujets à risque accru (voir pour revue, Jacobson et al., 2009). Plusieurs recherches suggèrent que les composés phénoliques retrouvés dans certains aliments présentent de puissants pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire pouvant limiter la

diminution de l'efficacité de protection des cellules contre les facteurs de stress cellulaire ainsi qu'un rôle dans le maintien de la neurogénése chez l'adulte (Joseph et al., 2005 ; Dias et al., 2012). Par ailleurs les effets révélés par ces études sont similaires à ceux observés lors d'une restriction calorique chronique et modérée, suggérant une voie d'action commune entre ces deux interventions (voir pour revue Joseph et al., 2009). En effet, la restriction calorique améliore la protection cellulaire contre les facteurs de stress et maintient l'activité et la « qualité » des neurones (Masoro, 2005; Piper et Bartke, 2008). De même chez le macaque rhésus, une RC de 30% a réduit l'atrophie cérébrale associée à l'âge et observée chez les animaux du groupe témoin dans les régions clés de la fonction motrice et des fonctions exécutives (Colman et al., 2009). Cependant l'application de tels protocoles dans un contexte thérapeutique est encore rare chez l'Homme et les modèles animaux utilisés, peuvent présenter des limites non négligeables telles que l'absence du développement naturel de certaines neuropathologies. Ainsi la majorité des études menées sur les rongeurs font intervenir des animaux transgéniques ou mutants, exprimant artificiellement des neuropathologies (ex : Alzheimer, Huntington). Nous avons évalué l'atrophie cérébrale grâce à la méthode d'IRM chez des microcèbes soumis à une restriction calorique chronique ou à un apport alimentaire chronique de resvératrol. L'objectif de l'étude est de mettre en évidence de probables effets bénéfiques de la restriction calorique à long terme sur le ralentissement du développement de l'atrophie cérébrale au cours du vieillissement normal et d'évaluer si le resvératrol présente des effets similaires. Ces résultats représentent la première approche d'un point de vue « morpho-fonctionnel » chez un primate non-humain dans le cadre de l'application de protocoles nutritionnels anti-âge.

Matériels et méthodes

L'examen des animaux par Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) a débuté à la 4ème année de traitement (âge : 72±7 mois), durant la saison de jours courts. Cet examen d'IRM a ensuite été effectué chaque année à la même période afin de suivre l'évolution du volume cérébral des microcèbes au cours du temps. Cette étude rapporte les résultats des images IRM pour le 1er passage (après 4 ans de traitement, âge : 78.9±1.4 mois) CTL n=5, RC n=9 et RSV n=7 et pour le 2ème passage (après 5 ans de traitement, âge : 90.9±1.3 mois) CTL n=3, RC n=3 et RSV n=2.

La procédure IRM s'est déroulée de la manière suivante : les microcèbes ont été mis à jeun la veille pour éviter tout risque de vomissements causé par l'anesthésique durant

l'examen. L'animal a été pré-médicamenté 20 minutes avant l'induction de l'anesthésie (0,0625 mg/kg d'atropine en sous-cutané, Lavoisier, France), puis anesthésié grâce à un mélange air/O2 (50/50) et Isoflurane à 4% (Forene®, Abbott). Une fois anesthésié, il a été placé dans le lit de l'appareil IRM, la mâchoire posée sur la pièce de gueule. Une arrivée de gaz positionnée au-dessus de la pièce de gueule a permis de maintenir l'anesthésie durant l'examen (Isoflurane compris entre 1,25 et 2%). La fréquence respiratoire de l'animal a été contrôlée grâce à un capteur de pression positionné sous son abdomen, connecté à un ordinateur (logiciel PC Samp32®). Un système de chauffage par air a permis de maintenir la température corporelle aux alentours de 37°C.

Les images cérébrales ont été acquises durant 32 minutes sur un spectromètre à 7 Tesla (Varian, CEA, Fontenay-aux-Roses) grâce à une sonde de surface (RapidBiomed, Allemagne) à quatre canaux. Les images en écho de spins à deux dimensions avaient une résolution isotropique nominale de 230 µm (TR/TE = 10 000/17,4 msec ; RARE-Factor = 4 ; Champ de vue = 29,44x29, 44 mm^3 ; Épaisseur de coupe =230 µm).

Les images ainsi obtenues ont ensuite été interpolées dans l'espace K (« zerofilling ») pour procurer une résolution dans le plan de 115 µm. La séquence d'acquisition utilisée a permis d'obtenir un contraste visuel optimal entre les sous structures cérébrales et le liquide céphalorachidien (Dhenain et al., 1997) (le LCR apparaît en hypersignal sur les images pondérées en T2).

A partir des images obtenues, trois types de mesures ont été réalisées, choisies par rapport aux études précédentes menées chez le microcèbe (Dhenain et al., 1997 ; Dhenain et al., 1998 ; Dhenain et al., 2000 ; Kraska et al., 2011 ; Picq et al., 2012) (**Annexe C**) :

- Une évaluation du volume de régions d'observation d'intérêt (ROIs) : le noyau caudé, l'hippocampe, le septum, le thalamus et l'amygdale
- Une évaluation semi-quantitative du volume du LCR avec scores (0 à 3) de chacune des structures précedemment citées
- Une évaluation de l'épaisseur de régions corticales : splénium, cortex frontal, cortex pariétal, cortex temporal, cortex cingulaire, cortex occipital.

Les volumes intracrâniens des ROIs ont été mesurés pour chaque animal grâce au logiciel Anatomist® (CEA, France). Chaque structure cérébrale a été segmentée

manuellement à partir de coupes coronales. Pour le septum et l'hippocampe, les délimitations ont été réalisées sur une coupe et les volumes intracrâniens respectifs ont été délimités sur cette même coupe de référence (voir **Annexe C**). Les volumes mesurés sont présentés en moyenne ± SEM μm^3.

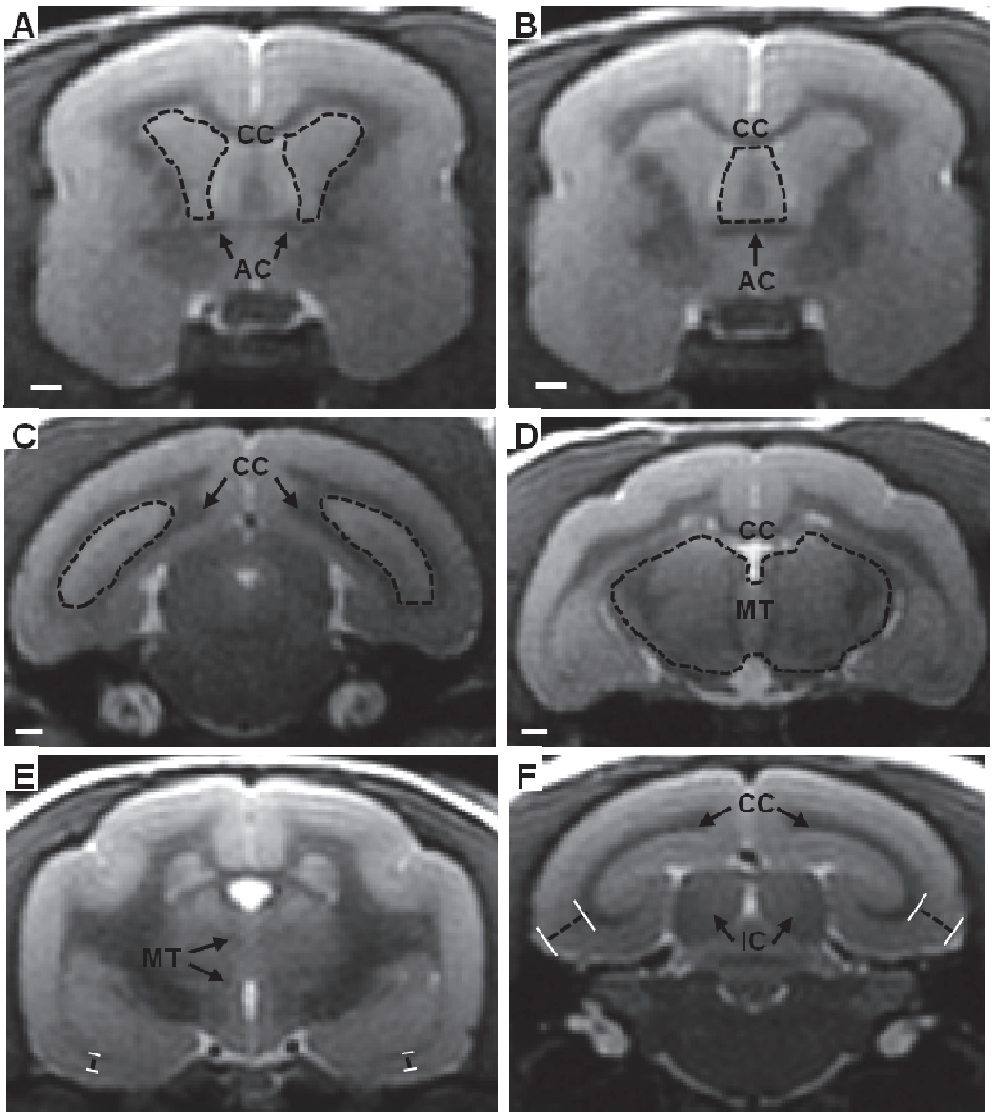


Figure 1. *Exemples de délimitation du noyau caudé (A), de la région septale (B), de l'hippocampe (C), du thalamus (D), du cortex entorhinal (E) et du cortex temporal (F) sur des images IRM coronales. Annotations: AC : commissure antérieure; CC : corps calleux; MT : faisceau mamillo-thalamique; IC : colliculi inférieurs. Barres d'échelle: 1 mm. (Pour plus de détails, consulter l'Annexe C).*

Pour tester l'effet du traitement, une analyse non paramétrique par Kruskal-Wallis one way a été réalisée pour chaque variable d'intérêt, concernant uniquement les animaux du 1er passage. Pour tester la relation entre les paramètres de l'IRM et l'âge, des régressions linéaires ont été effectuées (variable dépendante : volumes ou épaisseurs, variable dépendante : âge chronologique). Ces régressions linéaires ont englobées les animaux du 1er passage et les animaux du 2ème passage.

Résultats

- Evaluation du volume de régions d'observation d'intérêt (ROIs)

L'analyse par Kruskal-Wallis n'a révélé aucun effet des traitements concernant le volume des régions cérébrales étudiées (Figure 2): noyau caudé ($_{dF:2}$H=3,47, p=0,18) ; hippocampe ($_{dF=2}$H=1,52, p=0,47) ; septum ($_{dF:2}$H=0,2, p=0,91) ; thalamus ($_{dF:2}$H=2,01, p=0,35) et amygdale ($_{dF:2}$H=2,54, p=0,28). Cependant une relation négative a été observée entre l'âge chronologique et le volume de l'hippocampe uniquement chez les animaux CTL (t=-3,7 ; r=-0,76, p=0,01), et non chez les animaux traités RC (t=1,7 ; r=0,38, p=0,12) et RSV (t=0,06 ; r=0,03, p=0,9) (Figure 3).

- Evaluation semi-quantitative du volume de LCR (données non montrées)

L'accumulation de LCR n'a pas évolué en fonction des traitements : noyau caudé ($_{dF:2}$H=1,67, p=0,43) ; hippocampe ($_{dF:2}$H=1,03, p=0,59) ; thalamus ($_{dF:2}$H=1,05, p=0,59) ; région péri temporo-occipitale ($_{dF:2}$H=2,39, p=0,31) et score global ($_{dF:2}$H=1,06, p=0,58). Aucune relation n'a été révélée entre l'âge chronologique et la quantité de LCR pour les animaux de l'étude.

- Evaluation de l'épaisseur corticale (données non montrées)

Les différents traitements n'ont pas entrainé de variations concernant l'épaisseur corticale des cortex suivants : splénium ($_{dF:2}$H=0,08, p=0,96) ; cortex frontal ($_{dF:2}$H=1,11, p=0,57) ; cortex cingulaire ($_{dF:2}$H=0,41, p=0,81) ; cortex pariétal ($_{dF:2}$H=0,80, p=0,66) ; cortex temporal ($_{dF:2}$H=0,41, p=0,81) et cortex occipital ($_{dF:2}$H=2,61, p=0,27). Une relation négative a été observée entre l'âge chronologique et l'épaisseur du cortex cingulaire uniquement chez les animaux CTL (t=-2,75 ; r=-0,69, p=0,03), et non chez les animaux traités RC (t=-0,61 ; r=-0,19, p=0,55) et RSV (t=-1,7 ; r=-0,39, p=0,19) (Figure 4).

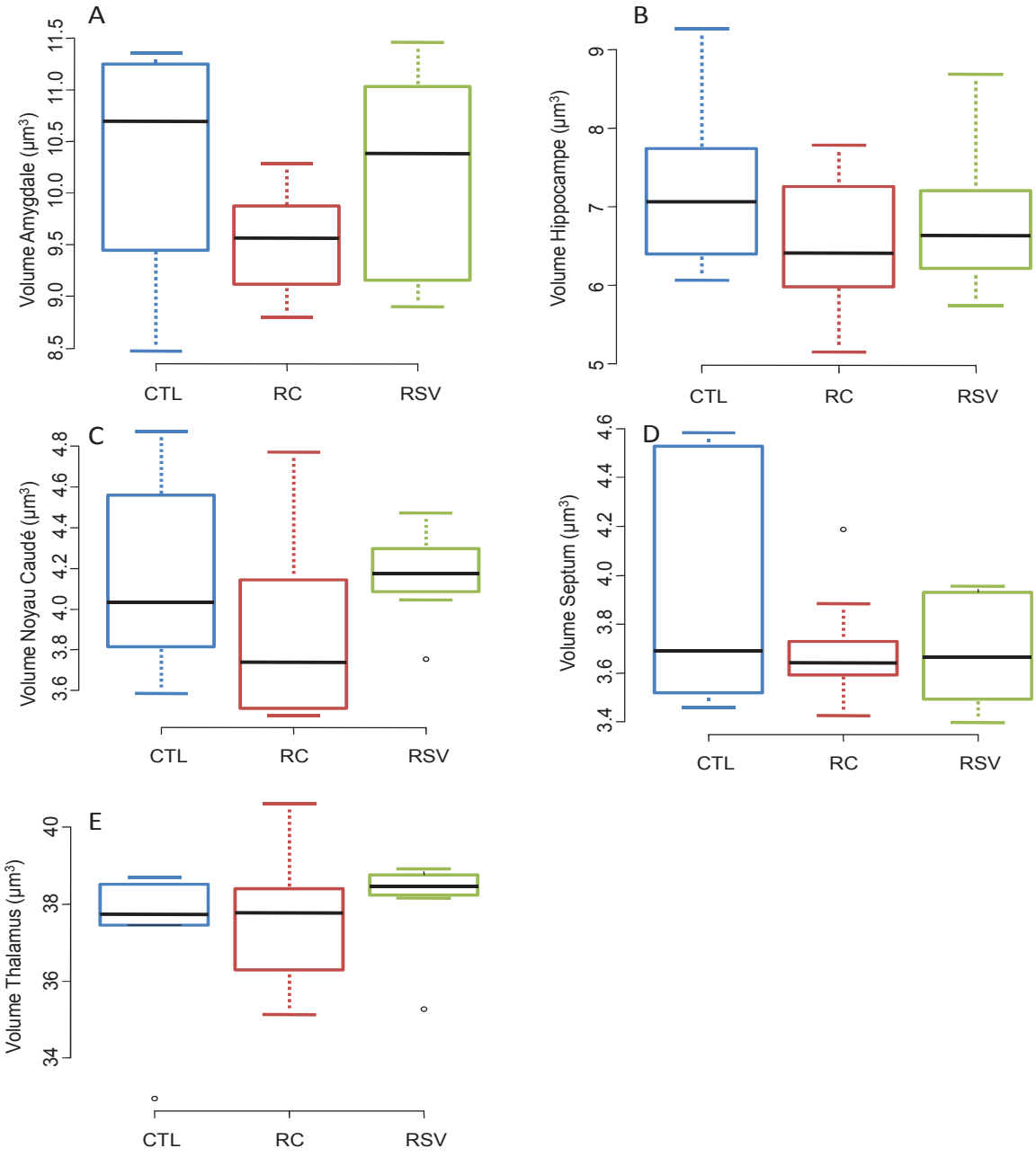


Figure 2. *Boites de dispersion (Médiane, 1 et 3ème quartile) des volumes (ajustés pour le volume intracérébral) des ROIs. En A : amygdale, B : hippocampe, C : noyau caudé, D : septum et E : thalamus. (CTL : animaux du groupe contrôle, RC : animaux du groupes restriction calorique et RSV : animaux du groupe supplémenté en resvératrol).*

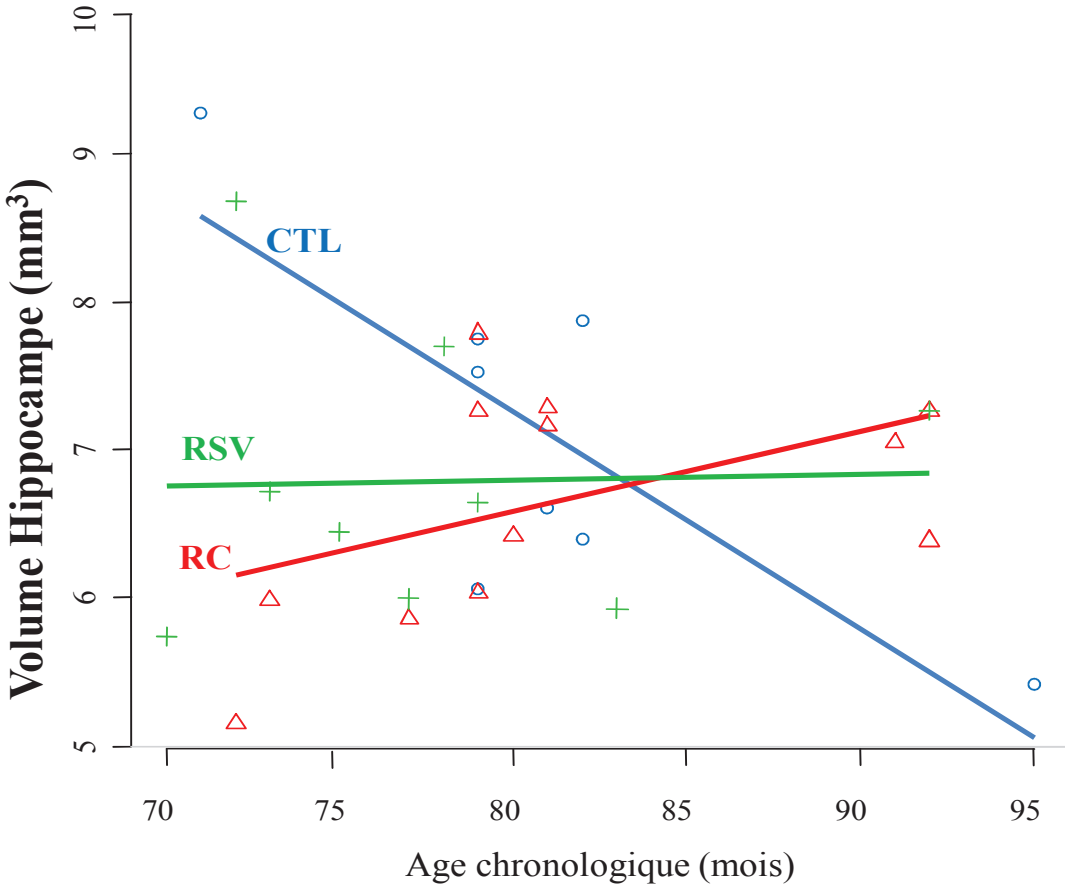


Figure 3. *Régression linéaire simple entre le volume de l'hippocampe (ajusté pour le volume intracérébral) et l'âge chronologique en mois. (CTL : animaux du groupe contrôle, RC : animaux du groupe restriction calorique et RSV : animaux du groupe supplémenté en resvératrol).*

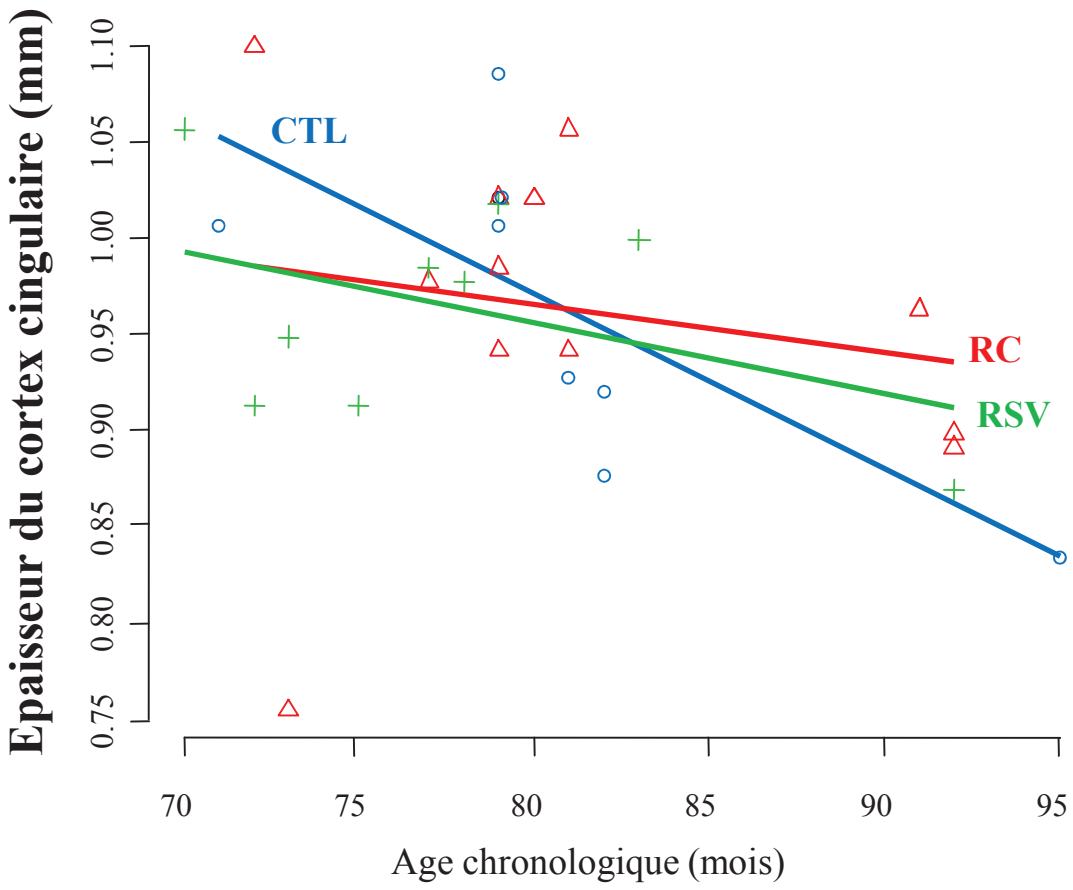


Figure 4. *Régression linéaire simple entre l'épaisseur du cortex cingulaire et l'âge chronologique en mois. (CTL : animaux du groupe contrôle, RC : animaux du groupe restriction calorique et RSV : animaux du groupe supplémenté en resvératrol).*

Discussion

Chez l'Homme, l'atrophie cérébrale qui se produit au cours du vieillissement normal ou pathologique, est l'une des perturbations du SNC la plus étudiée et décrite dans la littérature. Chez le microcèbe, des études ont montré que certains individus présentent une atrophie de certaines régions du cerveau qui commence généralement entre 5 et 8 ans et qui est caractérisée par une évolution rapide ; la plus marquée étant observée au niveau du cortex où les ventricules latéraux (renfermant du liquide céphalorachidien, LCR) s'élargissent par rapport aux animaux jeunes où ces cavités sont limitées (Bons et al., 1992). L'imagerie par résonance magnétique (IRM), une méthode non invasive d'exploration de l'anatomie cérébrale permet d'évaluer l'atrophie cérébrale au cours de l'âge chez le microcèbe (Dhenain et al., 2000, voir pour revue Joseph-Maturin et al., 2010).

L'analyse de la morphologie du cerveau des microcèbes du Restrikal n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes après 42 mois de traitement (4 ans de traitement). Bien que la méthode utilisée soit différente, ces résultats ne confirment pas la mise en évidence d'effets bénéfiques d'une RC de -30% chez le macaque rhésus (Colman et al., 2009). En effet à long terme (10 ans), les animaux restreints ont montré une diminution de la fréquence d'apparition d'atrophie du noyau caudé, du putamen et des régions corticales frontale, temporale et cingulaire (Colman et al., 2009). Plus récemment chez cette espèce, la RC a montré une diminution de l'intensité du stress (cortisol urinaire) au cours de tâches cognitives aversives et un retard d'apparition de la perte neuronale (étude des microstructures) et de l'atrophie au niveau des zones cérébrales impliquées dans la régulation émotionnelle : cortex préfrontal, amygdale et hypothalamus (Willette et al., 2012). Par ailleurs, bien que le RSV soit de plus en plus utilisé pour les études du vieillissement cérébral, les études sont encore fortement limitées aux propriétés neuroprotectrice et antioxydante de ce polyphénol, qui seraient à l'origine d'un maintien de la qualité et de la quantité des cellules neuronales, et ralentirait l'apparition de pathologies neurodégénératives liées à l'âge. Le RSV et la RC sont connus pour favoriser la conservation des neurones impliqués dans les fonctions mnésiques (Fontán-Lozano et al., 2008 ; Moriya et al., 2011) ; le RSV réduit l'expression de la dégénérescence neurofibrillaire chez *Nothobranchius furzeri* un poisson d'eau douce (Valenzano et al., 2006), et ces deux protocoles « anti-âge » protègent les neurones des effets neurotoxiques des β-amyloïdes chez des souris transgéniques (Karuppagounder et al., 2009) et chez le singe écureuil (Qin et al., 2006).

De manière interessante, nous observons chez les animaux contrôles, une relation négative entre le volume de l'hippocampe et l'âge chronologique d'une part et entre l'épaisseur du cortex cingulaire et l'âge chronologique d'autre part. Cette relation est, parallèlement, absente chez les animaux traités en RC et RSV. Les structures mesurées dans cette étude sont connues pour être atrophiées chez la plupart des microcèbes âgés (Kraska et al., 2011). L'atrophie de l'hippocampe et du cortex cingulaire peuvent également être des marqueurs associés aux pathologies neurodégénératives. Il semble que pour ces paramètres d'étude, la RC et le RSV « ralentissent » l'apparition ou la progression de l'atrophie de régions très spécifiques du cerveau, pourtant connues comme très sensibles au vieillissement chez les primates.

Ces résultats sont très prometteurs et l'analyse des images obtenues par IRM de manière longitudinale chez les microcèbes du projet viendront potentiellement confirmer ces

évidences. En effet, ces résultats ont été comparés à des mesures de références établies chez de jeunes mâles microcèbes (1-3 ans) provenant de l'élevage de Brunoy, démontrant que les animaux du Restrikal, après 4 ans de traitement, ne présentent pas encore de différences marquées avec les jeunes animaux. Ainsi, les effets bénéfiques potentiels de la RC et du RSV se déclareront certainement plus tardivement. Il est probable qu'en plus d'effets positifs sur l'évolution de l'atrophie cérébrale, ces protocoles jouent également un rôle neuroprotecteur, vu que nous avons démontré une non-accumulation de dommages cellulaires causés par le stress oxydatif chez les animaux traités (Chapitre 1) qui aurait pour conséquence le maintien des fonctions cognitives à un état « jeune ».

Conclusion – Chapitre II

Les capacités mnésiques et motrices ont été testées chez les microcèbes vieillissants afin de déterminer les effets d'une restriction calorique modérée ou d'un apport en resvératrol sur ces paramètres comportementaux au cours de l'âge. De manière complémentaire, une exploration « anatomique » du cerveau a été mise en place grâce à l'imagerie par résonnance magnétique pour petit animal, l'IRM, bénéfice technique majeur, afin d'évaluer l'atrophie cérébrale et de faire ressortir des relations entre régions cérébrales atrophiées et déficits cognitifs ou moteurs (pour le moment les effectifs sont réduits et les analyses en cours).

Nous avons pu démontrer que la restriction calorique chronique de -30% n'a pas altéré les fonctions cognitives contrairement a ce qui a été démontré chez certains modèles vertébrés, mais elle n'a pas permis non plus une amélioration des fonctions cognitives sensibles à l'âge comme la mémoire spatiale de référence. L'absence d'effet « anti-âge » de la RC sur les capacités mnésiques n'a pas été expliquée par des différences d'état de stress puisque le stress physiologique (cortisol) et l'activité exploratoire (Openfield) n'ont pas différé de celui des animaux CTL. Nous pouvons cependant penser que l'état motivationnel lors des tâches cognitives n'est pas le même chez les animaux restreints comparés aux contrôles. La RC a cependant agit de manière bénéfique puisque les performances motrices (particulièrement l'endurance et l'activité locomotrice spontannée) ont été maintenues par rapport au déclin observé chez les animaux du groupe CTL et l'anxiété a été diminuée. Le resvératrol a prouvé son efficacité à court terme et tout au long du traitement concernant la mémoire spatiale de travail (améliorée chez les animaux supplémentés comparé au groupe contrôle). Par ailleurs, malgré de fortes tendances, le RSV n'a pas engendré de modification au niveau des performances motrices, mais a significativement diminué l'anxiété de maniére similaire à la RC. De plus, les deux régimes ont entraîné des modifications comportementales à savoir une activité diurne accrue lors de la période de nourrissage chez les animaux restreints spécifiquement durant les jours longs qui correspond à la phase active chez cette espèce et une expression amplifiée de comportements agressifs chez les animaux supplémentés en RSV. Ces changements devront être confirmés dans le temps, pouvant

apporter des evidences pertinentes quant à des effets intrinséques associés à ces régimes à long terme sur les traits d'humeur notamment chez l'Homme.

Dans l'ensemble, les deux traitements montrent des effets hétérogènes mais bénéfiques. Certains effets de l'âge observés chez les animaux contrôles ont été contrés par la restriction calorique et par le resvératrol comme démontré pour les performances motrices (rotarod), l'anxiété dans un nouvel environnement (plus maze), le volume de l'hippocampe et l'épaisseur corticale du cortex cingulaire (IRM). Cependant les capacités motrices testées lors de l'épreuve du saut n'ont pas été améliorées par les traitements, de même que la mémoire spatiale de référence. Finalement le resvératrol a présenté un effet bénéfique concernant la mémoire spatiale de travail, non affectée par l'âge chez les animaux du groupe témoin révélant un effet propre à cette molécule, independamment de l'effet de l'âge.

La comparaison de la RC et du RSV permet de valoriser l'effet mimétique, ici partiel, attribué au resvératrol à travers la littérature, renforcé par les premiers résultats issus de l'analyse des images IRM, montrant une relation entre l'avancée en âge et l'atrophie cérébrale chez les animaux témoins, qui ne se retrouve pas chez les animaux traités. Les deux indicateurs essentiels du « ralentissement » du vieillissement sont d'une part le retard d'apparition de pathologies associées à l'âge, comme le démontrent la majorité des résultats du Chapitre 1 ainsi que certaines données du Chapitre 2, et d'autre part le retard du taux de mortalité. Ainsi le chapitre suivant est axé sur l'évolution des marqueurs du vieillissement et sur les premières données de longévité chez les microcèbes du projet RESTRIKAL.

CHAPITRE 3

Stratégies anti-âge : évolution des marqueurs du vieillissement et données de survie

Objectifs

Etude 7 : *Etude longitudinale chez le microcèbe : impact d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur l'évolution des marqueurs du vieillissement et sur la longévité*

Etude 8 : *Effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur le profil ante-mortem et sur la mortalité chez le microcèbe*

Conclusion



Objectifs – Chapitre III

La recherche sur le vieillissement a pour but principal l'acquisition d'une meilleure compréhension de la « série d'événements chronologiques » qui constitue le processus du vieillissement et qui conduit à une vulnérabilité accrue aux maladies avec l'âge, nécessitant des modèles expérimentaux robustes et la mise en place de stratégies « anti-vieillissement » qui pourraient contrer les rouages de ce processus complexe qui semble irréversible. Les objectifs de ce chapitre sont multiples :

- souligner le potentiel du modèle « microcèbe » pour l'étude du vieillissement
- apporter des évidences nouvelles, d'une part sur les effets de la restriction calorique (fortement documentés notamment chez les primates), et d'autre part plus particuliérement sur le resvératrol aux effets à long terme encore inconnus
- confronter les résultats émergeants des deux stratégies et valider le resvératrol comme mimétique de la RC chez ce modèle d'étude
- démontrer et valider ces protocoles comme « anti-âge » au travers des données de survie.

Ce chapitre s'appuie également sur les deux chapitres précédents. L'objectif principal de l'ensemble des études étant d'apporter des évidences quant aux effets bénéfiques de la restriction calorique et du resvératrol ; l'originalité étant que ces deux traitements soient menés de concert sur une période de plusieurs années chez un primate.

Etude 7 : Etude longitudinale chez le microcèbe : impact d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur l'évolution des marqueurs du vieillissement

Introduction

À ce jour, la seule intervention non génétique connue pour atténuer l'émergence de maladies liées au vieillissement et pour accroître la durée de vie chez plusieurs espèces animales est la restriction calorique sans malnutrition (RC). La littérature décrit amplement les effets bénéfiques de la RC (allant de -20 à -50%) principalement chez les rongeurs, le macaque rhésus et l'Homme. Bien que considérée comme intervention aux vertus « anti-âge » depuis des millénaires, les mécanismes de ce paradigme sont encore mal connus. Certaines études confirment l'importance centrale de l'adaptation métabolique à court terme qui engendrerait par la suite diverses cascades de régulations cellulaires bénéfiques, autrement dit l'induction d'un état métabolique « perturbé » qui favoriserait la longévité. Le recul sur les effets mimétiques du resvératrol reste fragile et les études longitudinales chez des modèles animaux pertinents seraient d'une grande aide pour comprendre par quels mécanismes, ce composé peut naturellement jouer un rôle « anti-âge » en mimant les effets d'une RC. Malgré de nombreuses études sur ces deux types de protocoles, aucune n'a encore mené de concert une RC et un apport alimentaire en RSV, qui plus est chez un primate. Pour tenter de répondre à de telles attentes, l'utilisation du microcèbe offre plusieurs avantages par rapport aux études sur les grands singes tels que le macaque rhésus : une durée de vie plus courte, des coûts réduits d'élevage et l'obtention plus rapide de résultats. Le premier objectif de cette étude est de déterminer comment une RC à long terme peut modifier la balance énergétique et la fonction endocrine, acteurs principaux pressentis dans les processus du vieillissement chez les mammifères. Le deuxième objectif étant d'évaluer si le RSV imite les effets de la RC. Ces résultats sont d'une importance majeure dans la validation et la mise en œuvre de ces protocoles à long terme chez les humains.

Matériels et méthodes

Depuis le début de l'étude Restrikal, un panel de tests a été organisé de manière chronologique, respectant à la fois le rythme saisonnier marqué chez cette espèce et le rythme circadien de ce primate nocturne. Le suivi longitudinal de paramètres jusqu'à la mort naturelle

des animaux permet d'appréhender les processus du vieillissement d'une part et de caractériser les réponses adaptatives aux traitements mises en place à moyen et long terme chez les microcèbes. Ainsi les paramètres d'étude peuvent être regroupés en grandes fonctions : la fonction métabolique (prise alimentaire, poids et balance énergétique), la fonction endocrine (IGF-1, testostérone, cortisol) et les données de survie. Les données ont été analysées par construction de modèles linéaires à effets mixtes dans le logiciel R 2.12.1 (R Development Core Team, Vienne, Autriche). Les variables explicatives étaient les effets fixes du traitement (CR vs CTL ou RSV vs CTL), de la saison (jours longs (JL) vs jours courts (JC)) et de la durée du traitement (Année 1 vs Année 2, Année 3 et Année 4) et leurs interactions. La variabilité interindividuelle, due en partie à la perte d'effectif par la mortalité au cours du temps, a été comptabilisée en déclarant l'identité individuelle comme effet aléatoire. Le meilleur modèle a été sélectionné par ML (vraisemblance maximale) en ne gardant que les effets significatifs (ANOVA). Un niveau de $p<0,05$ a été fixé pour la significativité des résultats, les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.

Résultats

Les résultats de cette étude présentent pour la première fois l'impact d'une restriction calorique à long terme et d'une supplémentation en resvératrol sur un ensemble de paramètres physiologiques et comportementaux, dont certains sont des marqueurs du vieillissement normal chez ce modèle primate (Perret et Aujard, 2006, Languille et al., 2012). Chez cette espèce, le vieillissement se traduit aussi par des changements morphologiques observables. Les signes distincts que l'on peut voir apparaître chez un microcèbe âgé sont : un blanchissement de la fourrure et un raccourcissement du museau et des oreilles. Les animaux du projet ont été photographiés régulièrement (Figure 1). De maniére générale, à l'âge de 8 ans, les animaux CTL présentent des signes externes marqués du vieillissement, alors que les animaux traités par RC ou RSV paraissent subjectivement « plus jeunes », avec une fourrure blanchissante et un racornissement des oreilles globalement moins prononcés que chez le CTL.

Les principaux résultats de cette étude longitudinale sont : (i) un impact du vieillissement est mis en évidence pour la plupart des paramètres, exceptés l'activité spontanée de jour ou de nuit et les concentrations de testostérone, (ii) la restriction calorique induit une réponse adaptative au niveau du métabolisme et de la balance énergétique mais le métabolisme basal n'a pas varié même lorsque celui-ci a été corrigé pour les variations de

masse corporelle, importante chez les restreints, le stress physiologique ne semble pas augmenter chez les animaux sous RC, ainsi qu'une nette diminution de l'hormone de croissance IGF-1 et de l'hormone sexuelle testostérone ont été révélés suggérant un compromis entre reproduction et survie, (iii) la supplémentation en resvératrol n'a pas montré d'effet mimétique sur les paramètres choisis montrant des effets inverses comparés à la restriction calorique notamment au niveau du métabolisme basal et des niveaux de testostérone accrus pendant la période de jours longs chez les animaux supplémentés, (iiii) les deux traitements semblent améliorer la survie comparé à la survie moyenne des animaux du groupe contrôle.

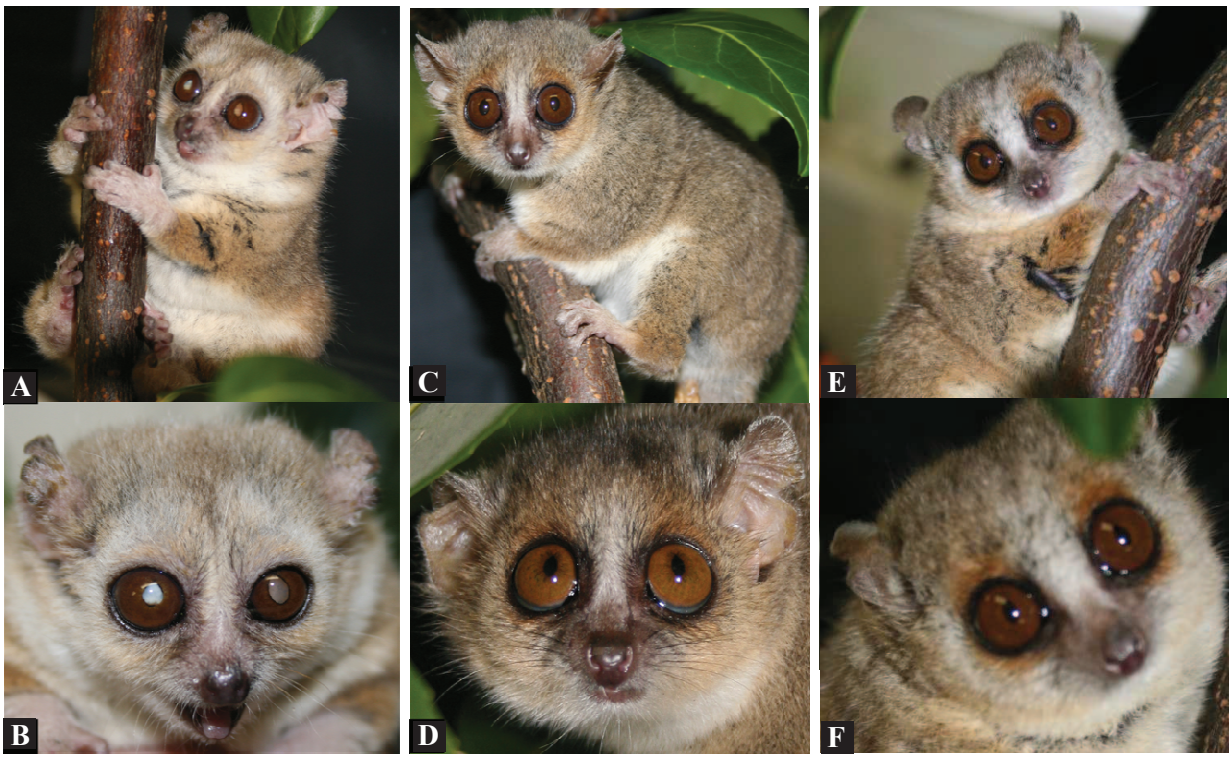


Figure 1. *Morphologie du microcèbe âgé de 8 ans appartenant au groupe CTL (A et B) ; appartenant au groupe RC (C et D) ou appartenant au groupe RSV (E et F). (Photos, Eric Gueton et Julia Marchal, 2012).*

Discussion

Depuis une vingtaine d'années, le resvératrol fait l'objet de nombreuses recherches particulièrement dans le domaine du vieillissement. Cette molécule aux multiples actions physiologiques, notamment par ses effets bénéfiques concernant l'inflammation et le stress oxydant (Kroon et al., 2010, Csiszar, 2011) est fortement pressentie pour « remplacer » une

restriction calorique au regard des similitudes des effets positifs obtenus. Cependant son impact sur le métabolisme chez des organismes à durée de vie longue et non-obèses reste à vérifier, car son potentiel sur le retard d'apparition de pathologies liées à l'âge et sur l'accroissement de la longévité est toujours fortement discuté dans le cadre du vieillissement normal et en l'absence de dérèglements métaboliques tels que l'obésité ou le diabète de type II (Baur et al., 2006). Nous avons comparé l'action d'une restriction calorique modérée chronique ou d'une supplémentation en resvratrol à des animaux nourris avec un régime standard dans le cadre d'une étude longitudinale du vieillissement normal. Nos résultats ne démontrent pas d'effets mimétiques du resvératrol en comparaison aux actions de la restriction calorique de l'âge adulte à l'âge de 8 ans en moyenne chez le microcèbe. Nous apportons cependant des preuves préliminaires quant à l'effet de ces interventions anti-âge sur la longévité puisqu'un ralentissement du taux de mortalité a été remarqué, en particulier lorsque l'on considère la durée médiane de survie par rapport aux animaux nourris avec un régime standard. De même, aucun effet délétère n'a été observé concernant les paramètres étudiés, à l'exception d'une diminution de la masse corporelle et du taux de testostérone chez les animaux restreints. Ces effets de la RC représentent quelques-uns des inconvénients dans le cadre d'une application à long-terme chez l'Homme. Des études longitudinales supplémentaires sont encore nécessaires pour évaluer le potentiel mimétique du resvératrol chez des organismes sains et non-obèses, y compris chez l'Homme.

Two paths, one arrival ? Long-term impact of calorie restriction and resveratrol on aging biomarkers in a primate, *Microcebus murinus*.

Authors: J. Marchal[1], A. Dal-Pan[1], F. Pifferi[1], E. Gueton[1], I. Hardy[1], M. Perret[1], M. Dhenain[2], S. Blanc[3], J. Epelbaum[4], J. Picq[1,5], F. Aujard[1], and on behalf of RESTRIKAL Consortium.

[1] UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France

[2] CEA, DSV, I2BM, MIRCen, URA CEA CNRS 2210, 18 Rte du Panorama Fontenay-aux-Roses Cedex, France

[3] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[4] Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences, UMR-S 894 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

[5] Laboratoire de Psychopathologie et de Neuropsychologie, EA 2027, Université Paris 8, 2 Rue de la Liberté, St-Denis, France

Corresponding author: Fabienne Aujard, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, 1 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy, France.

E-mail: aujard@mnhn.fr

Abstract

Resveratrol is a natural compound belonging to the group of polyphenols, shown as the molecule responsible for the French Paradox. This molecule has indeed anti-oxidant and anti-inflammatory properties affecting metabolism and energy balance. To this day, it is a prime candidate as a calorie restriction mimetic, but its beneficial effect on the delay of onset of age-related declines and increased longevity has not yet been demonstrated in non-obese models close to human as non-human primates. Our study focuses on the longitudinal monitoring of parameters of energy balance, endocrine function and mortality in a Malagasy primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). An initial cohort of 53 animals was divided into three treatments from adulthood: a group subjected to 30% calorie restriction (CR), a group supplemented with 200 $mg.kg^{-1}$ body $weight.day^{-1}$ resveratrol (RSV), compared to a control group fed a standard diet. CR induced metabolism changes by decreasing body weight and increasing physical activity, while resting metabolic rate was not modified. CR induced a marked decrease in growth and sexual hormones without increasing physiological stress. RSV increased calorie intake as well as resting metabolic rate, especially during the reproductive season, although body mass and physical activity were unchanged. Interestingly RSV enhanced testosterone levels according to seasonality but no effect was measured on plasma IGF-1 levels. RSV, in the same way as RC, seems to slow mortality rates comparable to those obtained with caloric restriction. In conclusion we show that dietary resveratrol partially mimics effects obtained during calorie restriction in a primate. Given these results, we may assume that profound changes during chronic CR led in adaptive response in restricted animals, associated with an energy balance regulation and lowered growth hormone while RSV may recruit different mechanisms leading in other metabolic modulations after a chronic intake in this species.

Key words

Anti-aging protocol; metabolism; endocrine function; lifespan; mimetic effect; grey mouse lemur

Introduction

It is projected that, by 2040, nearly 15% of the world's population will be >65 years old; by comparison, in 2008, only 8% of the worldwide population was represented by the >65 y.o (Banks et al., 2006). In addition, the number of older people will increase by a factor of 2.5 during this same period, from 530 million in 2010 to 1.3 billion by 2040. Recent data showed that one half of those elderly presented a chronic disease or some other form of disability (Akushevish et al., 2011). Consequently, the total societal burden of functional impairment and deteriorated health status will increase with the rise in the elderly population. To mitigate any age-related decline in autonomy, particularly that generated by nutrition-related chronic diseases, it is essential to develop strategies to promote well-aging. One solution, now properly documented since 1935, is calorie restriction without malnutrition (CR); the only non genetic intervention known to reduce the emergence of age-related diseases and to increase the life span in several animal species (Walford et al., 1987; Yu, 1994; Kemnitz, 2011; Omodei and Fontana, 2011). The literature amply describes the beneficial effects of CR (from -20 to -50%) mainly in invertebrate's model and rodents (Smith et al., 2011). Although considered as "anti-aging" paradigm for millennia, it is only recently that CR has proven its beneficial impact in long-lived species such as non-human primates and humans particularly by reducing disabilities or incapacity leading in loss of autonomy and by delaying the onset of chronic age-associated diseases as type II diabetes and heart diseases (Colman et al., 2009; Holloszy and Fontana, 2007; Fontana et al., 2007). However, this protocol seems difficult to establish in humans, especially in a long-term manner (Roth et al., 2001). Contemporary researches in the field of biology of aging, bio-gerontology and nutrition have made remarkable progress towards a better understanding of the proximal issues raised by aging and senescence. In this way, the development of mimetic effects of CR exploded (Ingram et al, 2006;. Baur et al, 2010.). Some studies confirm the central importance of metabolic adaptation in a short-term scale which would lead eventually in various beneficial cellular regulations (Anderson et al., 2008), ie the induction of a "disturbed" metabolic state that would promote longevity (Anderson and Weindruch, 2010). However, other evidence raises the fact that CR could induce a low chronic stress, stimulating a cascade of cellular and metabolic regulations at the origin of increased longevity (Rattan et al., 2004; Hipkiss, 2007; Marques et al., 2009). Among the CR mimetic candidates, resveratrol (RSV; 3,5,40-trihydroxy-trans-stilbene), a natural polyphenolic compound widespread in grapes and wine, is able to reproduce the wide variety of beneficial outcomes

lead by CR. But whether the adaptive metabolism responses generated by CR are similar under RSV remains controversial. RSV mimetic action may be explained cautiously by its low dose hormetic role as regards health benefit such as cardioprotection (Juhasz et al., 2010) or neuroprotective effects (Dasgupta and Milbrandt, 2007). Recently, a comparative study on CR and RSV impact has been led in obese and healthy humans by Auwerx and Schrauwen and colleagues; RSV inducing metabolic changes in several physiological markers, partially mimicking the effects of CR (Timmers et al., 2011). However the description of such mimetic effects remains somehow indecisive and scarce particularly in long-lived species, thus longitudinal studies in relevant animal models would be of great help in understanding the mechanisms by which this compound can naturally play its "anti-aging" action by mimicking - or not - the CR effects. Selected aging bio-markers may be used to evaluate the biological profile as well as the health status for animals subjected to “anti-aging” strategies. Such profiles may better correlate with biological age rather than with chronological age. This study aimed to examine, using a unique primate model (the grey mouse lemur), the specific impact of long-term dietary RSV or CR in phenotypic profiles associated with aging in multiple functions: energy balance, endocrine function, and locomotor activity. Since CR could induce several physiological modifications, a process that could lead to a delay in onset of age-related diseases and to an increase of lifespan, the second objective was to evaluate whether RSV mimics the effects of CR. These results are of major importance in the validation and long-term implementation of such protocols in humans, especially in the therapeutically context of aging studies.

Material and methods

Animals and breeding conditions

All grey mouse lemurs studied were males that were born in the laboratory breeding colony of Brunoy (UMR 7179 CNRS/MNHN, France; European Institutions Agreement # 962773), carried in the RESTRIKAL study at 38 ± 1 months old which is considered an adult age in this species and, they weighted 90 ± 5 g at the beginning of the study. Animals were housed individually in cages (50×60×70 cm) provided with wooden branches and wooden nests, in standard and constant conditions of temperature (24–26°C) and of relative humidity (55%). In captivity, seasonal variations of physiological and behavioral functions were entrained by alternating between 6 months of a long-day photoperiod (LD; 14:10 light:dark)

and 6 months of a short-day photoperiod (SD; 10:14 light:dark), under artificial light (white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Animals were fed fresh fruits and a daily mixture made up of ginger bread, cereals, milk and eggs; water was given *ad libitum* (Dal-Pan et al., 2011).

Dietary interventions

The RESTRIKAL study was already described in previous work (Dal-Pan et al., 2011). Briefly, 53 animals were randomly distributed into three different dietary groups at the age of 38±1 months: a control group (CTL) of 16 animals, a group of 19 animals submitted to calorie restriction (CR) that were fed the same diet but received 30% less than CTL (and a third group of 18 animals supplemented with resveratrol (RSV) that were fed the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of resveratrol per kilogram of body mass per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 5.2 $mg/kg.d^{-1}$ (Baur et al., 2006) and the 400 $mg/kg.d^{-1}$ (Lagouge et al., 2006). The daily amount of food given to the animals (15 g of mixture and 6 g of fresh fruit per day, equivalent to 105 kJ/day on average) was estimated from preliminary internal studies of the Brunoy laboratory over a year of measuring spontaneous food intake in isolated control adult animals (unpublished data). During the first 2 weeks of the SD period, animals remained undisturbed and more food (169 kJ/day) was given to allow annual fattening. Then, the amount was progressively decreased (128 kJ/day in the third week, 116 kJ/day in the fourth week) until the fifth week following the shift to SD when the amount of food was fixed for the rest of the year (102 kJ/day). The CR group was fed the same diet but received 30% less than the CTL group, which corresponded to an average of 71 kJ/day. All animals were followed with the same timing in the different protocols but for technical reasons and due to the mortality, the number of animals for each parameter analyzed differed.

Resting metabolic rate

Oxygen consumption was measured with a closed circuit respirometer. This protocol was applied four times per year, in the first and last third of each photoperiod (SD1, SD2, LD1 and LD2). For this nocturnal species, resting metabolic rate measurements on post-absorptive animals were performed during their daily resting period, 3-4 h before the end of the resting phase to avoid torpor metabolism. Animals were trained to nest in the respiratory chamber that consisted of an opaque chamber of 2.5 l with a woven floor to absorb any urine.

During the experiment, the respiratory chamber was placed in a cabinet at a controlled ambient temperature of 25.0 ± 0.5°C, a value within the thermoneutral zone defined for the mouse lemur (Perret et al., 1998). After a 20 min habituation phase under constant air-flow ventilation (2 $l.min^{-1}$) drawn through the respirometry chamber from bottom to top, the chamber was closed for a 40 min period. The volume of oxygen consumed by the animal was calculated from initial and final concentrations of O_2 in the chamber that were measured on dried gas using a Servomex 570 A paramagnetic gas analyzer (accuracy 0.01% O_2). The analyzer was routinely calibrated with N_2 and atmospheric air. O_2 consumption was adjusted for the body weight of the animal (Blanc et al. 2003). Body temperatures were not measured before the experiment to avoid disturbance of the sleeping animal but males never entered deep torpor at an ambient temperature of 25°C.

Spontaneous locomotor activity

Spontaneous locomotor activity was estimated once a year at the end of the LD period, the breeding season, when the animals are more active (Aujard et al. 2007). Spontaneous locomotor activity was estimated using a device with presence and motion sensors adapted to the mouse lemur (homemade system developed in the laboratory). Animals were housed individually in a cage with a capacity of 1 m^3 each provided with nest and supports in an ambient temperature controlled room (25°C). Eight presence sensors (Honeywell, transmitter: SEP8705003, receiver: SDP8405014) were placed on the nest entry to know when the animal was in the nest. These presence sensors were continuously recording. Moreover, two motion sensors (Gardtec, Gardscan 'M' series infrared detectors) were placed in the corners of the cage to detect the spontaneous movements of the animal during its activity period. If the animal was in movement, the motion sensors recorded data every two seconds. Data were stored in a computerized system (developed in the laboratory). They were then computed to represent the time course of these movement patterns using a software filtering "Actocebe 3.0" developed in language G from National Instruments. Total movements were averaged at 5-min intervals for analysis.

Hormonal assays

Blood collections were taken via the saphenous vein, without anaesthesia, at the end of the resting phase before the food allotment became available. Blood was collected in capillary tubes containing EDTA and immediately centrifuged (7,000 rpm at 4°C for 30 min) after

collection. One hundred microlitres was collected per sampling and represented less than 2% of the blood volume of the animal. Plasma was stored at –80°C.

Blood sampling for IGF-1 level analysis was performed four times a year, in the first and last third of each photoperiod (beginning and end of each SD and LD). IGF-1 level was measured, using an IGF-1 IRMA kit (Immunotech SA, Marseille Cedex, France). A dilution step was performed before the assay to dissociate IGF-1 from its binding proteins. The antibodies used in this immunoassay are highly specific for IGF-1 (extremely low cross-reactivity against insulin, pro-insulin, IGF-2 and growth hormone). Values were expressed in ng/ml.

Blood sampling for testosterone level analysis was performed three times a year, in the middle of the SD period and twice during the LD period (middle of each SD, beginning and end of each LD). Testosterone was assayed using the testosterone ELISA kit DE1559 (Demeditec, Kiel, Germany). After two distinct periods of incubation of 60 and 15 min with the different reagents, the optical density was read with a spectrophotometer at 450 nm (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA). Values were expressed in ng/ml.

Urinary cortisol excretion was determined to assess whether calorie restriction or resveratrol induced variations in physiological stress levels in mouse lemurs. To avoid the handling stress during urinary cortisol assessment, urine samples were collected one hour after the light turned off (cortisol of the day) and overnight (cortisol of the night) using a urine collector with ice placed below the cage of the animals. Urine samples were stored at −20°C until assayed. Urinary cortisol concentrations were measured twice on 10 µl of urine by an immunoenzymoassay (Demeditec Diagnostics, Germany). To control the variation in volumes and concentrations of the voided urine, the creatinine (Cr) content of each urinary sample was determined with a Cr colorimetric test (MicroVue kit, Quidel Corporation, San Diego, CA, USA). Urinary cortisol concentrations were expressed as microgram per gram of Cr.

Mortality data

Animals were followed until their spontaneous death. All animals that died during the study undergo a complete necropsy by a veterinarian. Based on specific criteria (rapid body mass loss, anemia, difficulty breathing), dying animals were deeply anaesthetized (100 mg/kg of pentobarbital, i.p.). After the complete necropsy, all organs were harvested and kept for

future analysis. Special attentions were given to the mouse lemur's brain to check it for Alzheimer-like pathology by further immunohistochemistry investigations.

Data analysis and statistics

The Shapiro-Wilk goodness-of-fit test was applied to determine whether the sample data were likely to derive from a normally distributed population. Variables which were not normally distributed were logarithmically transformed for analysis (calorie intake, IGF-1, testosterone and cortisol concentrations). Data were analyzed with linear mixed effect models (LME), built with the 'nlme' function in R 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Normality of models' residuals was checked by plotting normal quantile-quantile and Q-Q line. Explanatory variables were the fixed effects of treatment (Diet effect; CR versus CTL or RSV versus CTL), of seasonality (Season effect; SD versus LD), and of treatment duration (Time effect; Year 1 versus Year 2, Year 3 and Year 4) and all their interactions. Inter-individual variability was accounted for by declaring individual identity as random effects (between-individual variation in intercepts). The final restricted maximum-likelihood model, including only significant effects, has been achieved by deletion of the non-significant interactions and additive effects from the primary model, using ANOVA analysis to compare one model with another. The F-tests of the significance of effects were computed with models derived from the final model.

Results

Metabolic state

Seasonal variations in the mean ingested calories are represented in Figure 1. While restricted animals consumed less calories when compared to CTL (t_{50}=-7.84, $p<0.001$), ingested calories of RSV did not differ from those of CTL animals (t_{50}=1.65, $p=0.11$). CTL animals ingested 93.3±0.3 $kJ.day^{-1}$ in average during the 4-year treatment period while CR and RSV animals ingested 72.2±0.2 $kJ.day^{-1}$ and 98.4±0.2 $kJ.day^{-1}$ respectively. The mean percentage of restriction really applied throughout the first year (21%) increased with time: it was more important in the second year (22%), the third year (25%) and the fourth year (26%). Ingested calories changed significantly with seasons (89.4±0.2 $kJ.day^{-1}$ in SD and 85.4±0.2 $kJ.day^{-1}$ in LD), as expected because of the "boostage" periods to promote weight gain in the early period of short days (Fig. 1). Similarly, ingested calories significantly increased

throughout the 4 years of treatment (from the 1st year to the 4th year: CTL: from 85.9±0.5 kJ.day^{-1} to 102.3±0.4 kJ.day^{-1}; CR: from 68.3±0.3 kJ.day^{-1} to 75.8±0.4 kJ.day^{-1} and RSV from 90.4±0.4 kJ.day^{-1} to 105.4±0.4 kJ.day^{-1}, Fig. 1). Nevertheless, during the 4-year treatment period, caloric intake of CTL and RSV groups remained inferior to 100% (below 107.8 kJ.day^{-1}) of food allotment, confirming that both groups were fed *ad libitum.*

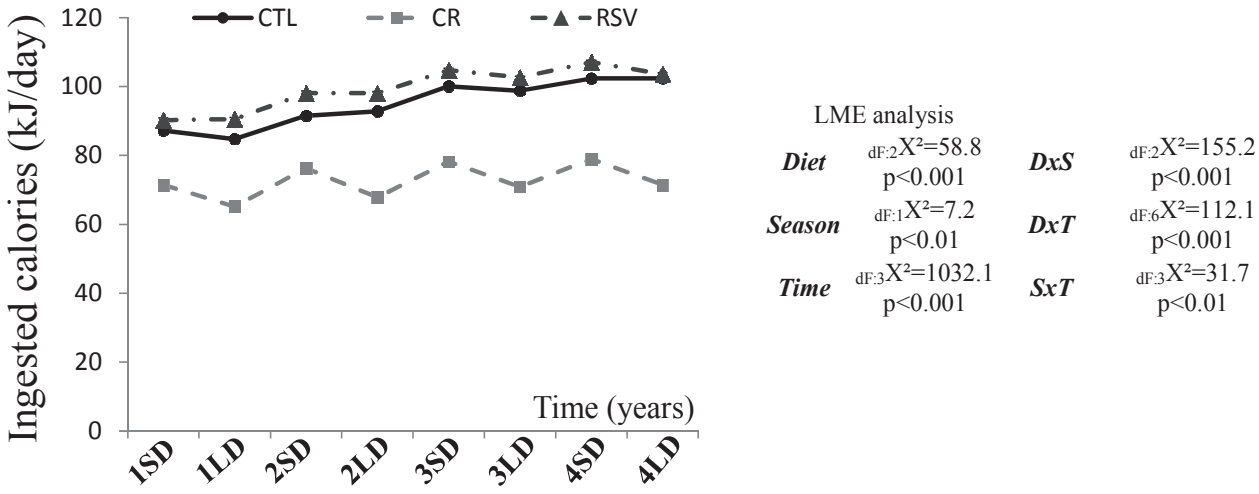


Figure 1. Mean ingested calories (kJ/day) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time.

As shown on figure 2, a general effect of treatment was revealed as CR animals presented lower body mass when compared to CTL animals (t_{50}=-2.75, p<0.01; 92.2±0.4 g vs 116.1±0.6 g) whereas body mass of RSV animals did not differ from body mass of CTL animals (t_{50}=-1.41, p=0.16; 112.2±0.5 g vs 116.1±0.6 g). Despite the decrease of mass in restricted animals, all the animals presented a seasonal variation (Fig. 2) of mean body mass during the 4 years of treatment with important fattening at the beginning of short-day period (CTL: 129.3±0.8 g ; CR: 106.2±0.5 g and RSV: 123.9±0.6 g) and a decrease in body weight during the long-day period (CTL: 101.3±0.6 g ; CR: 76.1±0.4 g and RSV: 98.9±0.5 g). There was also a strong effect of time (Fig. 2). Compared to the 1st year of treatment, the gap between the CR weight and that of CTL increased in the 2nd year (t_{8476}=-9.68, p<0.001; delta: 22.6 g) and in the 3rd year (t_{8476}=-18.21, p<0.001; delta: 37.4 g) but was less important during the 4th year (t_{8476}=-8.56, p<0.001; delta: 22.7 g). RSV group had a very different pattern to

that in control group. Indeed, while their body mass did not vary during the two first years, RSV body mass was lower in the 3rd year compared to CTL (t_{8476}=-5.09, p<0.001; 116.3±0.8 g vs 125.3±1.2 g) and higher in the 4th year compared to CTL (t_{8476}=2.46, p=0.01; 114.6±1.1 g vs 111.1±1.5 g). Finally, the crossed effect between treatment and season revealed that the mean body mass of CTL animals during the SD period was decreasing from the 3rd year to the 4th one (t_{8476}=-2.31, p=0.02; 140.1±1.4 g vs 117.9±1.4 g), while body mass of both CR and RSV animals did not change.

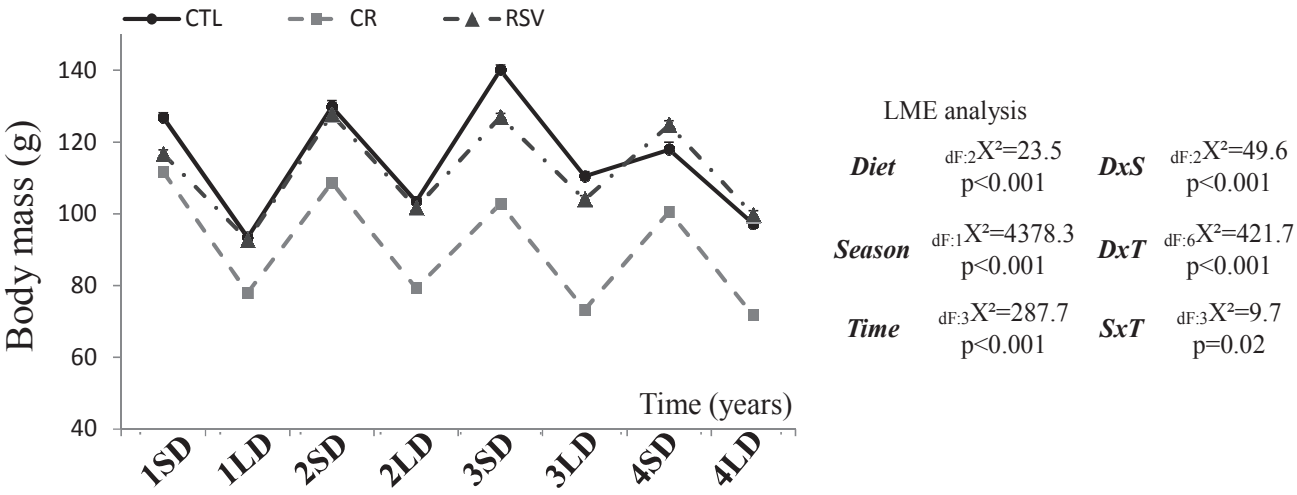


Figure 2. Mean body mass (g) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time.

Seasonal variations in brut resting metabolic rate (RMR) and in RMR adjusted for body weight variations are represented in Figure 3. RMR of the three groups varied according to photoperiod (p<0.001) with an averaged RMR of 98.1±1.5 $mLO_2.min^{-1}$ in SD and 88.8±1.4 $mLO_2.min^{-1}$ in LD. RMR progressively decreased across time (from the 1st year to the 4th year: CTL: from 106.6±3.3 to 71.1±4.6 $mLO_2.min^{-1}$; CR: from 98.7±2.6 to 74.3±3.7 $mLO_2.min^{-1}$ and RSV: from 115.4±2.9 to 84.2±3.8 $mLO_2.min^{-1}$). Despite no effect of treatment (p=0.14, CTL: 93.3±2.1 $mLO_2.min^{-1}$; CR: 86.3±1.6 $mLO_2.min^{-1}$ and RSV: 101.1±1.7 $mLO_2.min^{-1}$), there was a cross effect between treatment and season. Whereas restricted animals did not differ from CTL animals (t_{568}=-0.26, p=0.78), differences of RMR in RSV group during the LD period were significantly higher (t_{568}=2.18, p=0.03, 99.6±2.5 vs

87.1±2.5 $mLO_2.min^{-1}$). RMR values significantly varied with body weight (t_{568}=3.59, p<0.001), with higher RMR for greater body mass. Thus RMR values were adjusted for body mass variation (Fig. 3). There was no treatment effect whereas RMR values varied significantly according to season (p<0.01) and time (p<0.001). Indeed, as brut RMR, adjusted RMR was lower during the LD period as compared to the SD period. Similarly, values decreased with time, in all groups. Finally, RSV animals presented higher values in late LD season when compared to CTL animals (t_{568}=2.98, p=0.03) as revealed by the cross effect between treatment and season (p=0.02).

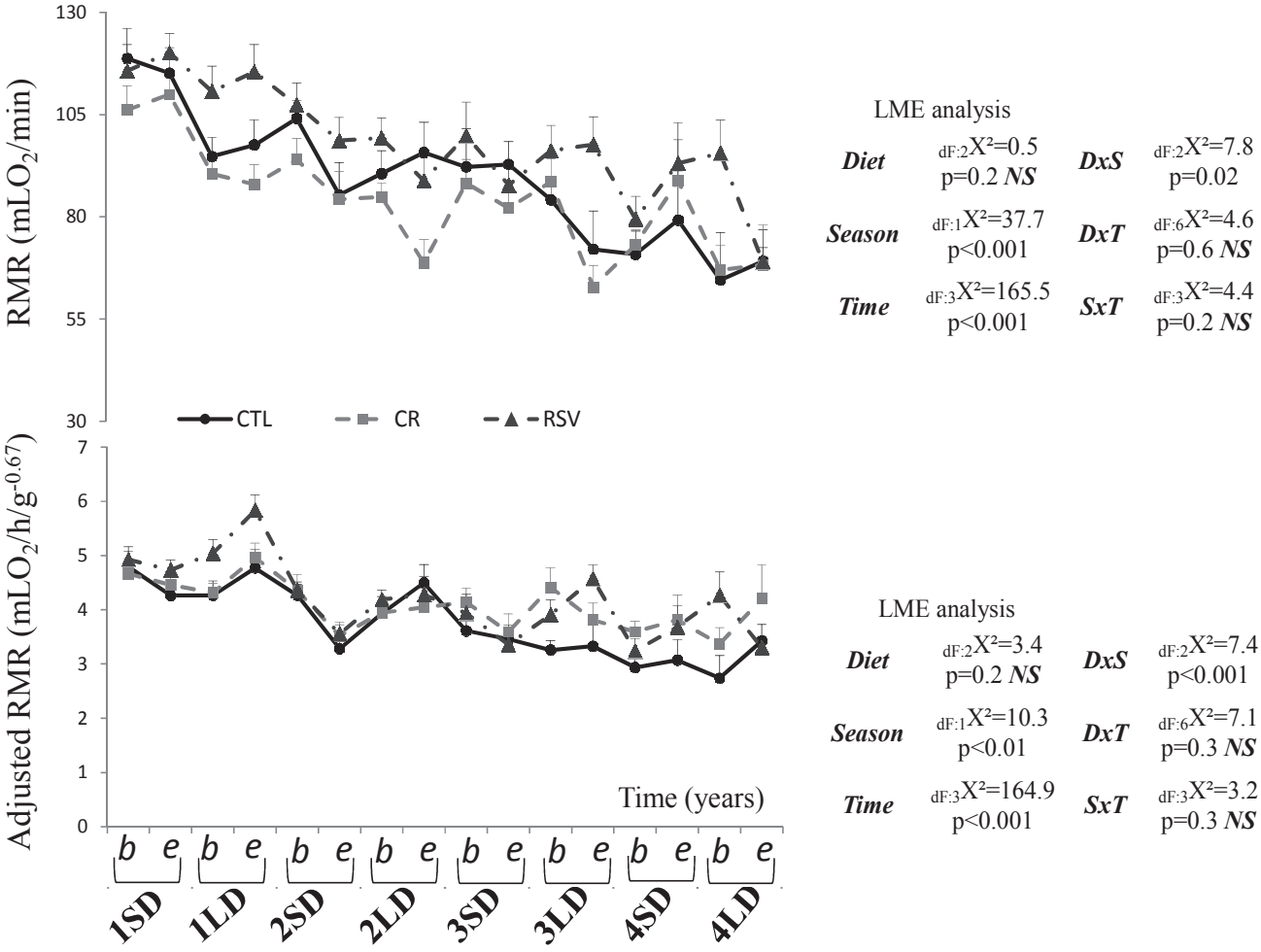


Figure 3. Resting metabolic rate (RMR), brut (mLO_2/min) or adjusted for body mass variation, in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (b: beginning; e: end of season; SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time, NS: no significant.

Seasonal variations in the physical activity: diurnal activity and nocturnal activity levels are represented in Figure 4. Nocturnal activity levels were not different between the diet group, even if levels appeared increased in CR animals (CTL: 647.1±132.8 a.u, CR: 1102.1±207.1 a.u and RSV: 838.1±150.2 a.u) but varied according to season, with greater levels during the long-day period compared to the short day season (1286.9±140.1 a.u vs 257.6±55.1 a.u). No time effect appeared concerning the nocturnal activity levels as activity remained similar across time (2nd year: 900.6±187.8 a.u; 3rd year: 930.4±155.9 a.u and 4th year: 807.4±190.1 a.u). As regards diurnal activity levels, a diet effect was reported (Fig. 4), restricted animals exhibited slightly higher levels during the day when compared to CTL animals (t_{38}=1.99, p=0.04, 175.3±36.4 vs 92.6±7.8 a.u), whereas RSV animals' activity was not different from that of CTL animals (t_{38}=-0.04, p=0.96; 93.1±11.9 vs 92.6±7.8 a.u). Nevertheless, no season effect was found, nor a time effect (Fig. 4).

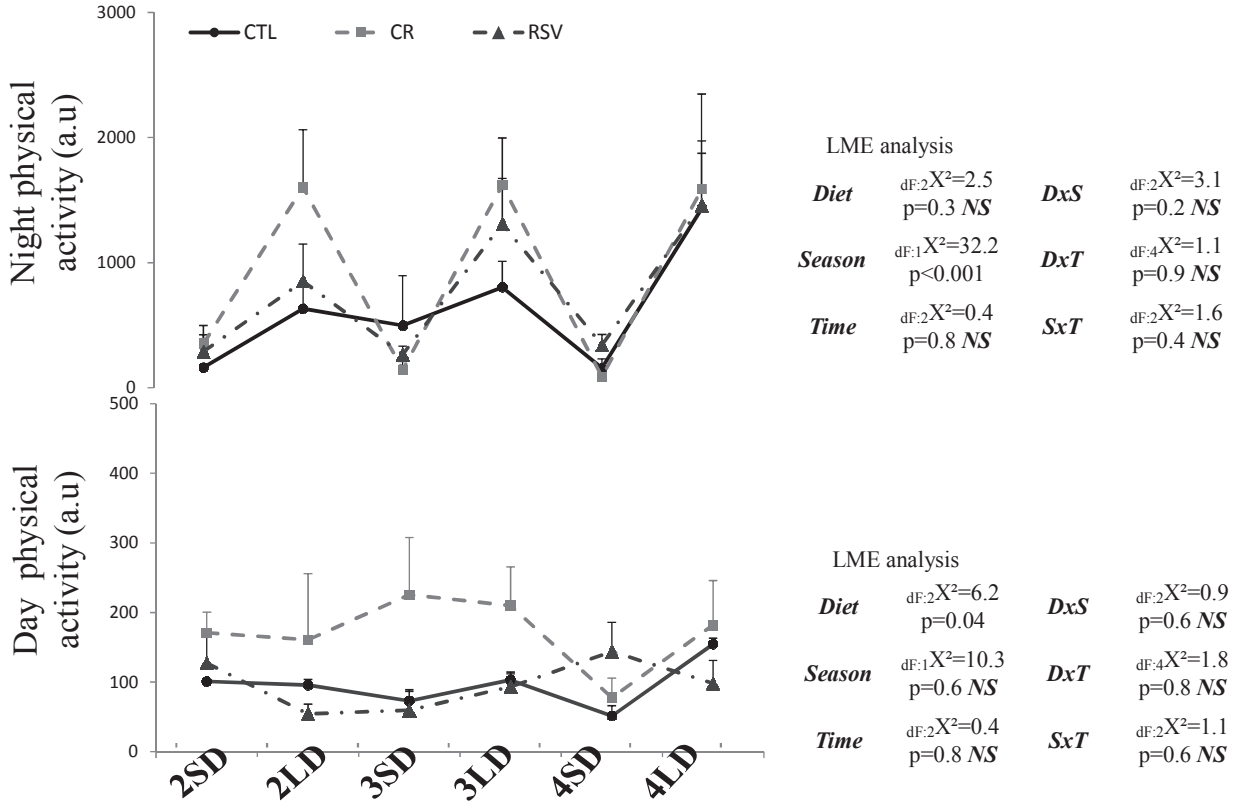


Figure 4. Spontaneous physical activity during the night and during the day (arbitrary unit), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time, NS: no significant.

Hormonal state

Data for IGF-1 levels obtained for the 4-year period are represented in Figure 5. Seasonal variations of IGF-1 level were conserved across years with higher levels during the long-day period compared to the short-day period ($p<0.001$; 366.4±12.6 vs 211.5±11.7 ng/mL). A general diet effect appeared through time (Fig. 5; $p<0.001$). Indeed, CR group presented lower values of IGF-1 when compared to the CTL group (237.5±13.6 vs 307.1±17.2 ng/mL), although RSV supplemented animals present similar IGF-1 concentrations pattern comparing with CTL animals (316.3±16.6 vs 307.1±17.2 ng/mL). Despite the treatment effect, IGF-1 values decreased with time ($p<0.01$, from 1st year to 4th year; CTL: from 334.5±28.4 to 314.4±52.1 ng/mL; CR: from 261.8±21.5 to 223.3±44.3 ng/mL and RSV: from 353.5±27.9 to 293.1±47.3 ng/mL).

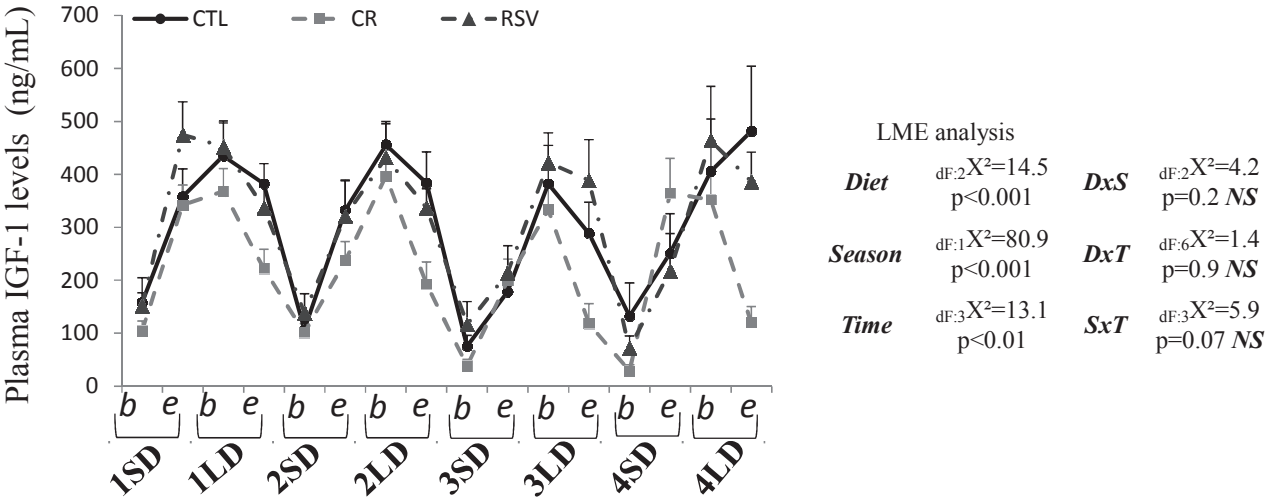


Figure 5. Plasma IGF-1 levels (ng/mL), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (b: beginning; e: end of season; SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time, NS: no significant.

Highly significant differences in testosterone levels (Fig. 6) occurred between each photoperiod in both years of treatment ($p<0.001$) with higher concentrations during the long day period compared to the short-day season (58.2±2.4 vs 11.4±1.2 ng/mL). Equally, diet affected this parameter ($p<0.01$). CR animals exhibited lower plasma testosterone values when compared to CTL animals (t_{50}=-2.48, p=0.01; 31.5±2.6 vs 43±3.4 ng/mL). In contrast

RSV group had similar testosterone levels pattern when comparing to the control group (t_{50}=1.32, p=0.19, 48.1±3.6 vs 43±3.4 ng/mL). Time effect was not significant (p=0.41). Nevertheless a cross effect was found between treatment and season (p=0.03), RSV animals presented higher values in the late phase of long-day period (t_{377}=1.85, p=0.06, 68.4±4.6 vs 60.9±4 ng/mL) compared to CTL animals, whereas CR animals presented no difference (t_{377}=-0.69, p=0.76, 45.5±3.5 vs 60.9±4 ng/mL).

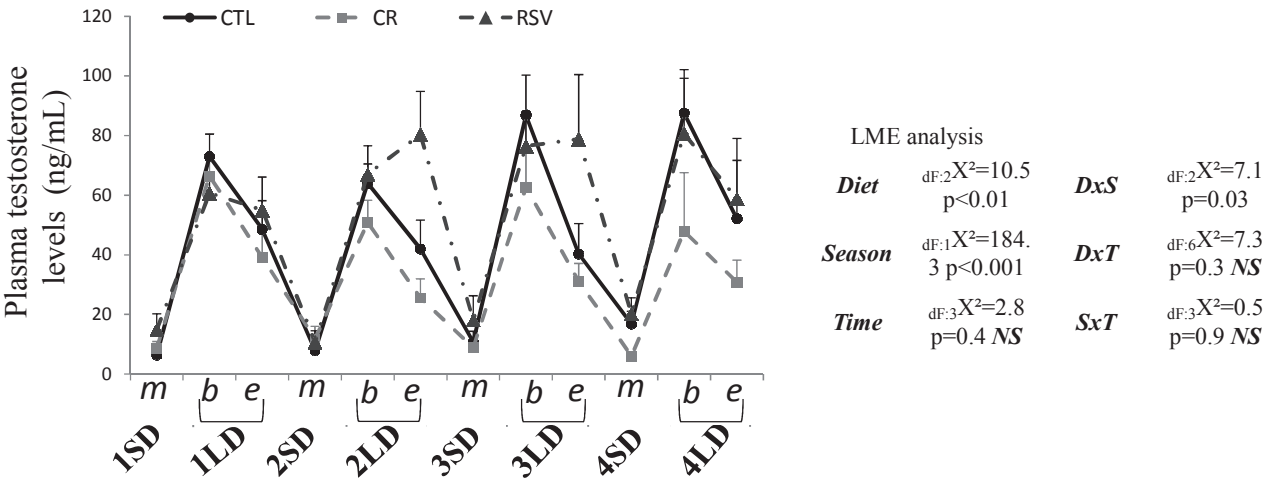


Figure 6. Plasma testosterone levels (ng/mL), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (b: beginning; m: middle; e: end of season; SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time, NS: no significant.

Seasonal variations in urinary cortisol levels (adjusted for creatinine variations) during the diurnal phase and during the nocturnal phase are represented in Figure 7). Diurnal urinary cortisol values varied significantly according to season (Fig. 7, p<0.001) but no effect of treatment (p=0.16) nor time (p=0.22) were found. Cortisol concentrations were higher during the long day season compared to the short day season (917.8±64.8 vs 490.3±32.7 ng/mL). Cortisol values during the nocturnal phase varied significantly with season (Fig. 7) without variation according to treatment (p=0.61). Again, cortisol values were greater during the summer-like season compared to the winter-like season (1119.3±62.8 vs 686.1±57.9 ng/mL). Additionaly, cortisol concentrations varied with time (p=0.03). Independently of treatment, cortisol levels decreased progressively with time with a significant 43% drop within the 4-

year treatment duration (levels averaged 916.8±55.9 ng/mL in the 1st year, 976.1±114.2 ng/mL in the 2nd year, 723.3±93.5 ng/mL in the 3rd year and 524.5±82.1 ng/mL in the 4th year).

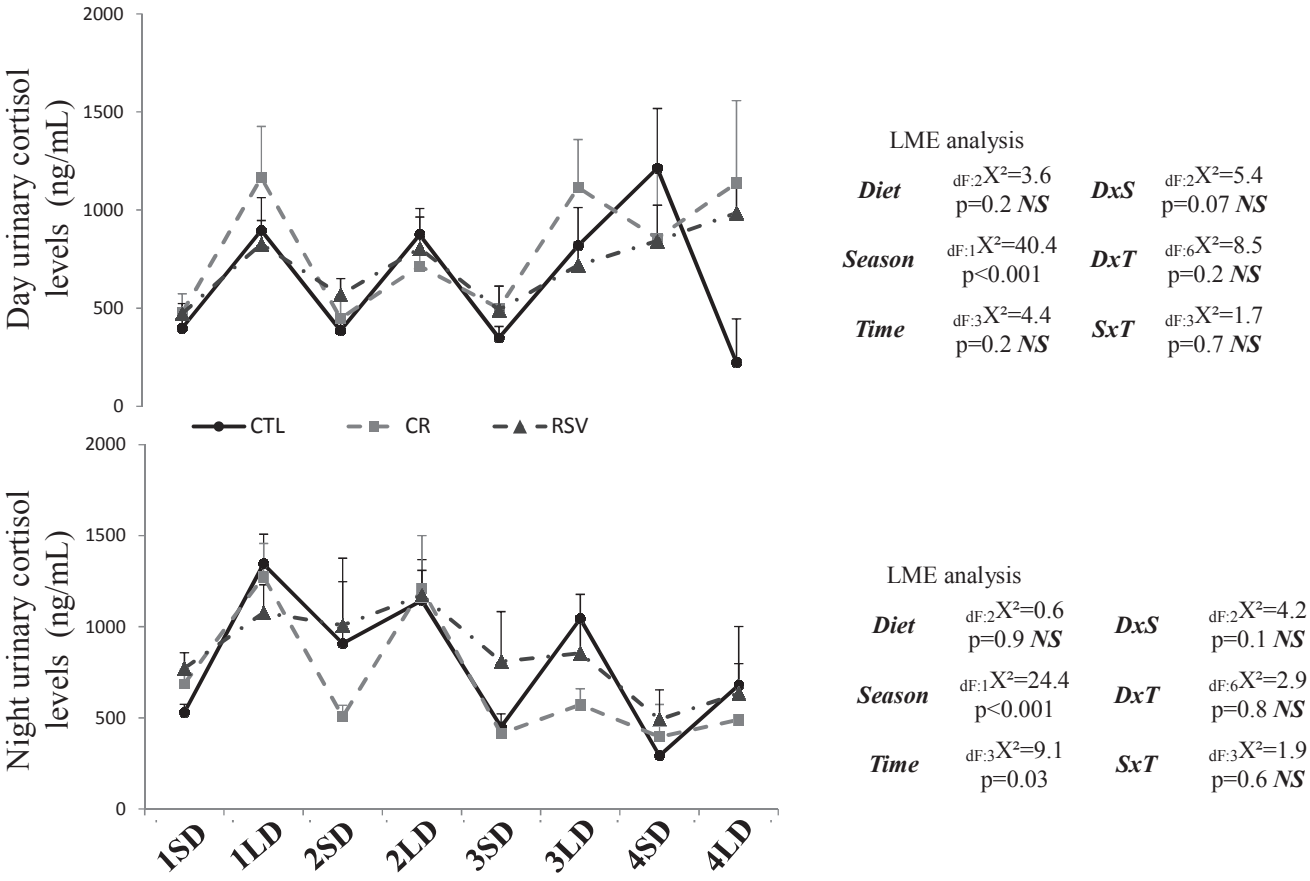


Figure 7. Urinary cortisol levels (ng/mL; adjusted for creatinine variations), in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to year and seasons (SD: short day photoperiod; LD: long day photoperiod). LME analysis are reported besides, X^2: statistical value of L-ratio, crossed effect DxS: diet x season; DxT: diet x time; SxT: season x time, NS: no significant.

Survival data

After 4 years of study, a first survival curve was achieved as regard the lemurs studied in the RESTRIKAL project (Figure 8). Control animals from the RESTRIKAL study showed a half-life of about 6.5 years. Treatment presented positive effect, as calorie restriction and resveratrol intake slowdown mortality and enhanced the survival rate compared to the control group. When the CTL animals reached their median survival time, 50% at 6.5 y, the CR

animals have a survival rate of 72% for the same age and RSV animals presented a survival rate of 63%.

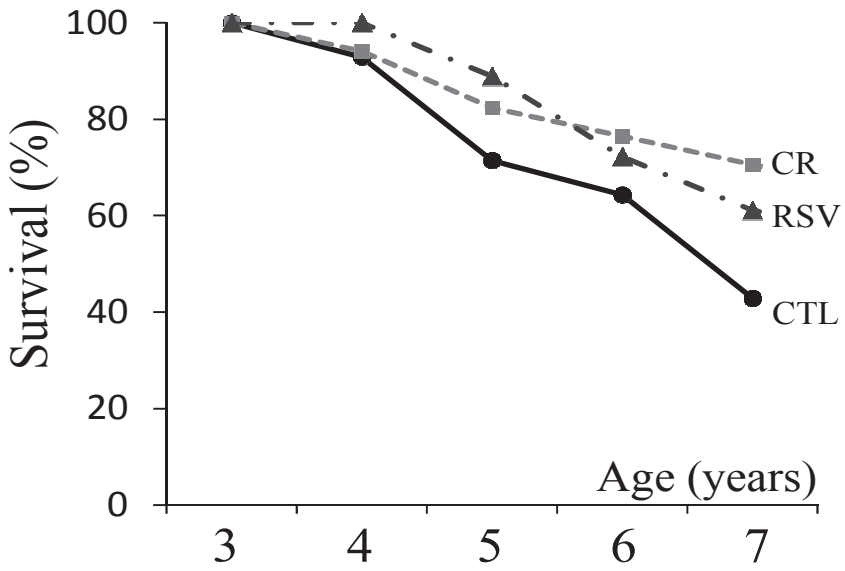


Figure 8. Survival rate (%) in each diet group (CTL: control; CR: calorie restriction; RSV: resveratrol intake) according to chronological age.

Discussion

Calorie restriction has been extensively studied in cellular and animal research with beneficial results (Speakman et Mitchell, 2011); but yet anti-aging investigation screens for CR mimetic to avoid potential disadvantages caused by long-term CR, especially in order to apply such protocol to humans. Different physiological parameters have been longitudinally followed in male grey mouse lemurs belonging to either a control group, fed with a standard diet or submitted to a calorie restriction of 30% or supplemented with a chronic dose of resveratrol. The majority of aging markers have been modified by the caloric restriction and/or the resveratrol supplementation and seasonal variations of most markers were maintained among the three groups, confirming the long-term adaptation of animals to their respective regimes.

Are CR effects on metabolism mimicked by resveratrol?

Assuming the fact that energy balance is altered by a 30% CR, we expected that restricted animals counteract the caloric resources abatement by decreasing their energy expenditures. The difference which occurred in body weight between the CR and CTL

animals have increased with the duration of treatment, associated with the rising percentage of calorie restriction revealed by progressive growth in calorie intake in CTL animals. However, RMR did not vary with CR and it decreased with age in both CR and CTL animals. Moreover, physical activity increased independently to season and time, during the diurnal phase, during which normally this nocturnal species is in resting state. One explanation is an acute feeding behavior induced by hunger. Restricted animals are more active, waiting for the feeding time (Marchal et al., in prep) which takes place at the end of the day. CR treatment seems to slow the decline in physical performances observed in older animals as demonstrated in a previous study (Marchal et al., in prep). We have no evidence about other parameter of energy balance such as postprandial and physical activity thermogenesis, but we may hypothesize that restricted animals save energy by reducing thermogenesis from digestion. Another explanation may be the fact that the RMR evaluated the whole body metabolic rate during the resting phase. But it has been shown that metabolic rate is highly dependent of the type of tissue and organs (Nelson etal., 1992; Toth, 2001; Kaiyala et al., 2010). Finally restricted animals may compensate on another energy balance regulation factor; the daily torpor. It is well described that mouse lemurs use this energy saving strategy to face environmental constraints as food scarcity. Previous studies implied this strategy as an adaptive response to food shortage (20 to 80%) for a short duration (Canale et al., 2010; Terrien et al., 2011). This adaptive response illustrates the phenotypic plasticity of this animal. A long-term CR with an increasing percentage in time may better constraints animals to adjust their energy balance with greater efficiency.

Resveratrol did not impact as much the metabolic parameters, as their outcomes follow very similar pattern comparing to the control group. Similarly to CTL animals, resveratrol treated animals increase their calorie intake. While values of CTL animal's body weight were maximal during the 3rd year, it decreased during the 4th year, especially during the short day season, as described in the breeding colony in aging animals (Perret and Aujard, 2006). RSV treated animals exhibited a higher body mass during the 4th year and maintain their body mass gain through age during the short-day season, which may be interpreted as a maintenance of this biomarker of aging. Interestingly, RMR in RSV animals was higher during the long-day season; even when values were adjusted for body mass variations, but the total spontaneous activity remain similar when compared to the control group. However, it has been demonstrated that RSV intake exerted favorable metabolic adaptation found during a CR, including in humans (Heilbronn et al., 2006; Civitarese et al., 2007). These energy

balance regulations include reduction in sleeping metabolic rate and RMR, but a 30-day RSV intake failed to decrease energy expenditure in obese humans as expected in comparison with CR (Timmers et al., 2011). Another 15-week follow-up study demonstrated that low or high dose of RSV did not increase energy intake in obese mice submitted to a high-fat diet, neither induced changes in metabolism (body weight and adiposity) (Tauriainen et al., 2011). From our study, RSV seems to maintain certain energy balance parameter as body weight but it increases the RMR during the long-day period, the active and reproductive season in this species, without increasing the physical activity. Resveratrol is also known to promote the mitochondrial biogenesis; especially in muscular cells (Zheng et al., 2012), thus the increase of RMR may be due to a rise in quantity and "quality" of mitochondria. Nevertheless, it is important to remind that the great majority of these studies, including humans, have been conducted in obese or obese like state models induced by high calorie diet. We cannot exclude that the long-term administration of resveratrol induce adaptive responses in mouse lemurs, and that their metabolism, trained by photoperiods, is different from those of rodents and humans.

Are CR effects on endocrine function mimicked by resveratrol?

Our results exposed a progressive but rapid decrease in plasma IGF-1 levels in restricted animals. Even a slight decrease in all groups was observed with the advancing age was described, CR animals presented lower overall levels. Many studies have already reported a reduction of circulating IGF-1 levels by CR, as well as insulin and glucose, outcomes we already demonstrated in a previous study after 2 and 3 years of CR treatment (Marchal et al., 2012). Moreover the reduction in insulin and IGF-1 signalling has widely been causally linked to the lifespan rise in several species (Kappeler et al., 2008; Speakman and Mitchell, 2011), probably due to its direct action on oxidative stress resistance (Holzenberger, 2004). In long lived rodent strains and in humans, lifespan is often limited by spontaneous tumorigenesis. Studies have determined that the ability of CR to inhibit spontaneous tumorigenesis is linked to the CR-mediated reduction in circulating IGF-1 (Hursting et al., 1993) and in the case of mammary carcinogenesis can be reversed by the administration of IGF-1 to CR animals (Dunn et al., 1997). However, a long-term CR in humans failed to decrease IGF-1 levels (Fontana et al., 2008). In RSV animals, IGF-1 levels were not different compared to the CTL group. Nonetheless, RSV intake enhances IGF-1 production in specific brain region in mice, which has been linked to improved cognitive performances (Harada et al., 2011). In contrast, high-dose (2.5g) of RSV for 1 month in

humans has shown to decrease circulating IGF-1 after ingestion, a reduction which may explain the chemopreventive activity of RSV by limiting cellular growth and proliferation via IGF-1 concentrations regulation (Brown et al., 2010). No aging related decline in testosterone were noted in CTL, suggesting that the rate of this hormone decline after the age of 7 in the mouse lemur (Perret et Aujard, 2006). However, despite seasonal variations maintained throughout the project, testosterone varied differently depending on treatment followed by animals. A decrease in food intake seems to cause a decrease in reproductive functions, probably because of energy constraints due to regime, as restricted mouse lemurs exhibited markedly lower testosterone levels. Some theories of aging state that minimizing the reproductive functions, which led in spending energy limitation, could potentially lead to a lengthening of lifespan as revealed during CR (see for review, Holliday, 2006). In contrast, RSV causes a sharp increase in the rate of testosterone in late summer which may be explained by a shift of the peak secretion of this hormone, later in this season. Previous research demonstrated the beneficial impact of RSV on sexual hormone and quality of sperm in rats (Juan et al., 2005). Urinary cortisol levels were assessed to determine whether CR or RSV induce a stress response after a long-term treatment period in mouse lemur. We did not show any effect of both calorie restriction and resveratrol on cortisol levels. Acute CR in mouse lemurs did not change cortisol levels either (Canale et al., 2010). In *in vitro* RSV studies however, cortisol is increased by a promoting effect of RSV in mitochondria (Li D et al., 2012) but these evidences are not reproduced *in vivo*. Our results underline and support the good adaptation to the respective regimen, even after a 4-year period in this primate species suggesting that both CR and RSV do not lead in a more stress state.

Based on literature on CR (Lin et al. 2000; Tissenbaum and Guarente 2001, Anderson et al. 2003; Howitz et al. 2003; Ingram et al. 2006) and RSV effect on longevity (Valenzano et al. 2006; Zarse et al., 2010; Wang et al., 2011; Rascon et al., 2012), we expected that the mean lifespan of the restricted would increase by a minimum of 30% as some studies suggested that there is a linear relationship between the restriction percentage and the extent of both median and maximum lifespan (Speakman and Hambly, 2007; Merry, 2005). We also expected comparable extent in the RSV-supplemented groups by CR effect mimicry. Comparing to curve corresponding to the survival evolution of 282 animals (born and dead in the laboratory), the median survival time, which corresponds to a survival rate of 50% of the population is about 5.7 years in male mouse lemurs (Languille et al., 2012). Here we found a 6.5 year median lifespan in CTL animals. This difference can be explained by the fact that

control animals are isolated from each other throughout their entire lives, thus avoiding the risk of injury or death due to sexual competition between males in summer. Control animals have a survival rate of about 62% where animals from the breeding have already reached their half-life. When 50% of the control animals were still surviving, 22% and 13% additional treated animals were surviving at the same age, in CR and RSV group respectively. These results are promising and further assessment in the current cohort may confirm this beneficial effect later.

In conclusion, we demonstrate beneficial effects of CR regarding metabolism markers while RSVenhanced hormonal profile. We also bring evidences about a slow-down in mortality rate in both CR and RSV groups, especially when considering the median survival time in comparison with animals fed a standard diet. Although most of the CR effects were not mimicked by the RSV intake, our results and the survival data are very consistently pointing toward beneficial health and life-span. We did not observe deleterious effect by CR nor RSV concerning the studied parameters, except the decrease in body mass and in sexual hormone in restricted animals, which are some of the drawbacks toward a human application. Regarding the mimetic ability of RSV in our study, one hypothesis would be that RSV may beneficially impact metabolism in a short-term scale and depending on the applied dose, when originally metabolic dysfunction are currently existing like obesity, metabolic syndrome or type II diabetes. Given these results, we may assume that profound changes during chronic CR led in adaptive response in restricted animals, associated with an energy balance regulation and lowered growth hormone while RSV may recruit different mechanisms leading in other metabolic modulations after a chronic intake in this species.

Acknowledgements

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Eric Gueton, Sandrine Chertouk and Lauriane Dezaire for daily feeding and care provided to the animals. We thank the RESTRIKAL Consortium: Fabienne Aujard, Roger Botalla, Alexandre Dal-Pan, Eric Gueton, Isabelle Hardy, Laurine Haro, Julia Marchal, Fabien Pifferi, Martine Perret, Jérémy Terrien, Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Centre National de la Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle, France; Stéphane Blanc, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, France; Jacques Epelbaum, Philippe Zizzari, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894

Inserm, France; Jean-Luc Picq, Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, France. This study was conducted with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research.

Disclosure statement

The co-authors declare no conflicts of interest and no financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence the present work.

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Studies were conducted through the agreement of Internal Review Board of the UMR 7179 and in accordance with the recommendations of the Weatherall report, ‘‘The use of non-human primates in research’’, special attention was paid to the welfare of animals during this work to minimize nociception.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

References

- Akushevich I, Kravchenko J, Akushevich L, Ukraintseva S, Arbeev K, Yashin A. Cancer Risk and Behavioral Factors, Comorbidities, and Functional Status in the US Elderly Population. ISRN Oncol. 2011: 415790.

- Anderson RM, Latorre-Esteves M, Neves AR, Lavu S, Medvedik O, Taylor C, Howitz KT, Santos H, Sinclair DA. Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. Science. 2003; 302(5653):2124-6.

- Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R. Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. Aging Cell. 2008; 7(1):101-11.

- Anderson RM, Weindruch R. Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. Trends Endocrinol Metab. 2010; 21(3):134-41.

- Aujard F, Cayetanot F, Terrien J, Van Someren EJ. Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate. Exp Gerontol. 2007; 42(11):1079-87.

- Banks J, Marmot M, Oldfield Z, Smith JP. Disease and disadvantage in the United States and in England. JAMA. 2006; 295(17):2037-45.

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006; 444(7117):337-42.

- Baur JA. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. Mech Ageing Dev. 2010; 131(4):261-9.

- Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J. Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(1):16-23.

- Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, Vasilinin G, Sen A, Schinas AM, Piccirilli G, Brown K, Steward WP, Gescher AJ, Brenner DE. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. Cancer Res. 2010; 70(22):9003-11.

- Canale CI, Perret M, Théry M, Henry PY. Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate. J Exp Biol. 2011; 214(Pt 4):551-60.

- Civitarese AE, Smith SR, Ravussin E. Diet, energy metabolism and mitochondrial biogenesis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007; 10(6):679-87.

- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction

delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science. 2009; 325(5937):201-4.

- Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, Marchal J, Zahariev A, Chery I, Zizzari P, Perret M, Picq JL, Epelbaum J, Blanc S, Aujard F. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus. Age (Dordr). 2011; 33(1):15-31.

- Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(17):7217-22.

- Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. Cancer Res. 1997; 57(21):4667-72.

- Fontana L, Villareal DT, Weiss EP, Racette SB, Steger-May K, Klein S, Holloszy JO; and the Washington University School of Medicine CALERIE Group. Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 293(1):E197-202.

- Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. Aging Cell. 2008; 7(5):681-7.

- Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. J Nutr Biochem. 2011; 22(12):1150-9.

- Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. JAMA. 2006; 295(13):1539-48.

- Hipkiss AR. Dietary restriction, glycolysis, hormesis and ageing. Biogerontology. 2007; 8(2):221-4.

- Holliday R. Aging is no longer an unsolved problem in biology. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1067:1-9.

- Holloszy JO, Fontana L. Caloric restriction in humans. Exp Gerontol. 2007; 42(8):709-12.

- Holzenberger M. The role of insulin-like signalling in the regulation of ageing. Horm Res. 2004; 62 Suppl 1:89-92.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003; 425(6954):191-6.

- Hursting SD, Switzer BR, French JE, Kari FW. The growth hormone: insulin-like growth factor 1 axis is a mediator of diet restriction-induced inhibition of mononuclear cell leukemia in Fischer rats. Cancer Res. 1993; 53(12):2750-7.

- Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA, Roth GS. Development of calorie restriction mimetics as a prolongevity strategy. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1019:412-23.

- Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, de Cabo R, Mattison JA. The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. Biogerontology. 2006; 7(3):143-8.

- Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. J Nutr. 2005; 135(4):757-60.

- Juhasz B, Varga B, Gesztelyi R, Kemeny-Beke A, Zsuga J, Tosaki A. Resveratrol: a multifunctional cytoprotective molecule. Curr Pharm Biotechnol. 2010; 11(8):810-8.

- Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. Diabetes. 2010; 59(7):1657-66.

- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Périn L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J, Le Bouc Y, Holzenberger M. Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. PLoS Biol. 2008; 6(10):e254.

- Kemnitz JW. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. ILAR J. 2011; 52(1):66-77.

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 2006; 127(6):1109-22.

- Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, Devau G, Dhenain M, Dorieux O, Epelbaum J, Gomez D, Hardy I, Henry PY, Irving EA, Marchal J, Mestre-Francés N, Perret M, Picq JL, Pifferi F, Rahman A, Schenker E, Terrien J, Théry M, Verdier JM, Aujard F. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing Res Rev. 2012; 11(1):150-62.

- Li D, Dammer EB, Sewer MB. Resveratrol stimulates cortisol biosynthesis by activating SIRT-dependent deacetylation of P450scc. Endocrinology. 2012; 153(7):3258-68.

- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. Science. 2000; 289(5487):2126-8.

- Marchal J, Blanc S, Epelbaum J, Aujard F, Pifferi F. Effects of chronic calorie restriction or dietary resveratrol supplementation on insulin sensitivity markers in a primate, Microcebus murinus. PLoS One. 2012; 7(3):e34289.

- Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. Hormesis as a pro-healthy aging intervention in human beings? Dose Response. 2009; 8(1):28-33.

- Merry BJ. Dietary restriction in rodents--delayed or retarded ageing? Mech Ageing Dev. 2005; 126(9):951-9.

- Nelson KM, Weinsier RL, Long CL, Schutz Y. Prediction of resting energy expenditure from fat-free mass and fat mass. Am J Clin Nutr. 1992; 56(5):848-56.

- Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. FEBS Lett. 2011; 585(11):1537-42.

- Perret M, Aujard F, Vannier G. Influence of daylength on metabolic rate and daily water loss in the male prosimian primate Microcebus murinus. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 1998; 119(4):981-9.

- Perret M, Aujard F. Aging and biological rhythms in primates. Med Sci (Paris). 2006; 22(3):279-83.

- Rascón B, Hubbard BP, Sinclair DA, Amdam GV. The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. Aging. 2012; 4(7):499-508.

- Rattan SI. Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004; 59(7):705-9.

- Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Caloric restriction in primates and relevance to humans. Ann N Y Acad Sci. 2001; 928:305-15.

- Smith DL Jr, Nagy TR, Allison DB. Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research. Eur J Clin Invest. 2010; 40(5):440-50.

- Speakman JR, Hambly C. Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan. J Nutr. 2007; 137(4):1078-86.

- Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. Mol Aspects Med. 2011; 32(3):159-221.

- Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, Finckenberg P, Kovalainen M, Huotari A, Herzig KH, Lecklin A, Mervaala E. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and Fatty liver formation. J Nutr Metab. 2011; 525094.

- Terrien J, Perret M, Aujard F. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. Front Biosci. 2011; 16:1428-44.

- Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. Cell Metab. 2011; 14(5):612-22.

- Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Nature. 2001; 410(6825):227-30.

- Toth MJ. Comparing energy expenditure data among individuals differing in body size and composition: statistical and physiological considerations. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2001; 4(5):391-7.

- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol. 2006; 16(3):296-300.

- Walford RL, Harris SB, Weindruch R. Dietary restriction and aging: historical phases, mechanisms and current directions. J Nutr. 1987; 117(10):1650-4.

- Wang C, Wheeler CT, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M, Spangler E, Kern B, de Cabo R, Zou S. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in Drosophila melanogaster. Age (Dordr). 2011.

- Yu BP. How diet influences the aging process of the rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1994; 205(2):97-105.

- Zarse K, Schmeisser S, Birringer M, Falk E, Schmoll D, Ristow M. Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult Caenorhabditis elegans. Horm Metab Res. 2010; 42(12):837-9.

- Zheng J, Chen LL, Zhang HH, Hu X, Kong W, Hu D. Resveratrol improves insulin resistance of catch-up growth by increasing mitochondrial complexes and antioxidant function in skeletal muscle. Metabolism. 2012; 61(7):954-65.

Etude 8 : Effet d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol sur le profil ante-mortem et sur la mortalité chez le microcèbe

Introduction

Dans les sociétés occidentales, le nombre de maladies chroniques liées au vieillissement comme l'obésité, le diabète, les insuffisances rénales et certains types de cancers, présentent des incidences en constante progression (Crews, 2005). Alors que la restriction calorique est capable de retarder l'apparition de certaines maladies associées à l'âge et ce chez plusieurs espèces animales, il reste quand même difficile d'évaluer un tel potentiel chez l'Homme, au vue de la longévité de notre espèce. Par ailleurs, le resvératrol a prouvé son efficacité, particulièrement dans le cadre de pathologies liées au dérèglement métabolique, comme le diabète de type II, le syndrome métabolique et l'obésité. De manière générale, ce sont les données de survie qui sont rapportées dans les études sur la RC et le RSV chez les modèles expérimentaux du vieillissement et les causes de mortalité dans le cadre de ces recherches sont rarement décrites. Pourtant l'application de tels protocoles à l'Homme nécessite l'obtention de résultats à la fois sur les données de survie mais également sur la mortalité et les causes de celle-ci qui peuvent varier d'un traitement à l'autre.

Chez le microcèbe, certaines maladies, associées ou non à l'âge ont été documentées pour les animaux provenant de l'élevage de Brunoy et sont parfois comparables à celles observées chez le macaque rhésus ou chez l'Homme (Perret, 1982; Uno et Poff, 1983 ; Uno et Walker, 1993). Des examens histologiques ont été effectués sur une période de 10 ans sur 164 microcèbes morts spontanément en captivité (Perret, 1982). Les principales lésions constatées étaient la néphrite chronique concernant 90% des animaux, la nécrose du myocarde, des insuffisances respiratoires et des lésions de la rate, du foie et de l'estomac. Ces lésions ont été associées aux pathologies suivantes: hypothyroïdie progressive, hypercorticisme stable, hyperactivité médullo-surrénale et troubles sexuels (atrophie testiculaire). Ces évidences montrent que, mis à part certains cas rares de décès par cancer généralisé ou infection microbienne, l'ensemble de la population captive présente avec l'âge des symptômes, plus ou moins marqués, d'insuffisance rénale qui conduit à la mort. Ces troubles observés chez des microcèbes captifs semblent être le résultat du processus de vieillissement, puisque les

conditions de maintien en captivité offrent une exposition minimale aux facteurs de risque environnementaux. Une des explications pourrait être une surcharge de sécrétions cortico- et médullo-surrénales, induite par des facteurs de stress qui se produisent en captivité, dont le stress social. Nous rapportons dans cette étude les taux de mortalité des microcèbes du projet Restrikal soumis à une restriction calorique ou à un apport en resvératrol, ainsi que les différentes causes de mortalité qui ont pu être mises en évidence. Ces données offrent des résultats utiles à la fois pour les études menées sur des cohortes de microcèbes captifs mais également pour le développement de protocole de prévention des maladies liées à l'âge.

Matériels et méthodes

Pour déterminer l'état de santé d'un microcèbe, ainsi que le phénotype de vieillissement de chaque individu, nous avons évalué la prise alimentaire et la masse corporelle essentiellement. Les individus étant hébergés dans des cages individuelles, les marqueurs sociaux couramment utilisés dans l'élevage de Brunoy (isolement, accès à la nourriture…) n'ont pu être pris en compte. Par ailleurs, l'observation de l''activité générale, les profils endocriniens, certains marqueurs sanguins ont également servi pour l'évaluation de l'état de santé des microcèbes subissant les différents traitements. Tout animal mort dans le projet Restrikal a subi une nécropsie complète et la cause du décès a été déterminée sur critères visuels avec l'aide d'un vétérinaire. Sur cette base, nous avons distingué les décès qui sont dus à l'âge des causes de mortalité liées à des « perturbations » aiguës indépendantes du vieillissement. Seuls les animaux retrouvés morts et frais, ou euthanasiés lorsque cela était nécessaire ont subi une nécropsie. Les organes et tissus prélevés ont été fixés pendant 48h dans une solution de PFA (4%) et conservés à 4°C dans du PBS (0,1M). Certains organes comme le cerveau ont été (une moitié) directement congelés à -80°C pour des analyses ultérieures. Ces analyses ont été menées sur 9 animaux CTL, 9 animaux RC et 9 animaux RSV.

Résultats

Les taux de mortalité (ln) ont été rapportés à l'âge chronologique des animaux (Figure 1). Le taux de mortalité des animaux CTL est sensiblement supérieur à celui des animaux traités (intercept). Par ailleurs, l'âge moyen à la mort a été calculé (Figure 2). Alors que les animaux CTL meurent en moyenne à l'âge de 62,2±5 mois, les animaux sous restriction calorique meurent en moyenne à l'âge de 72,5±7 mois et les animaux supplémentés en resvératrol meurent en moyenne à l'âge de 73,1±5 mois. Autrement dit les animaux traités ont

un âge moyen à la mort plus élevé de pratiquement 1 an comparés au animaux CTL, mais cette différence est non significative (Kruskal-Wallis, $_{dF:2}H=2,08$, p=0,352). Nous nous sommes également intéressés aux différentes causes de la mort, ainsi qu'à l'incidence de la photopériode sur le taux de mortalité chez les microcèbes. Dans l'ensemble la mort des animaux est survenue plus fréquemment pendant la période de jours longs (JL) c'est-à-dire pendant la saison active des microcèbes comparé à la saison de jours courts (JC) avec des proportions respectives de 70,4% en JL versus 29,6% en JC (test du X^2, p=0 ,03). Cependant cette tendance ne semble pas constante entre les trois groupes d'animaux. Chez les animaux CTL, 77,7% des individus sont en morts en JL contre 22,3% en JC (test du X^2, p=0,09), chez les animaux restreints cette différence s'inverse, avec 33,3% des individus morts pendant la période de jours longs contre 66,6% morts pendant la période de JC (test du X^2, p=0,3). Enfin chez les animaux RSV l'incidence de la photopériode a été fortement exprimée avec 100% des animaux morts pendant les jours longs.

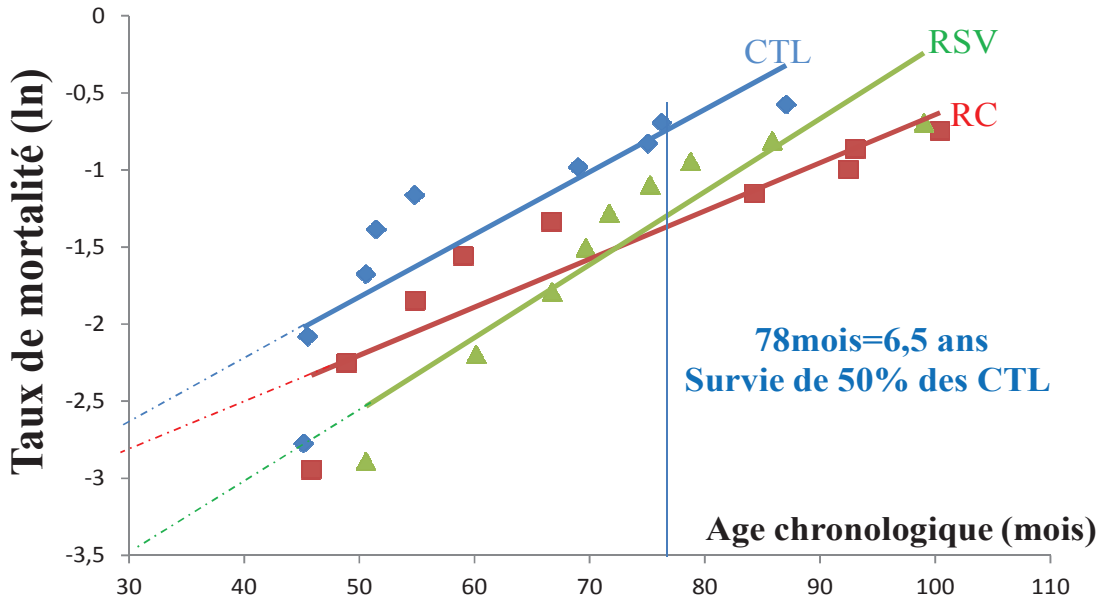


Figure 1. *Evolution des taux de mortalité en fonction de l'âge chronologique (en mois), pour chaque groupe d'animaux CTL : animaux contrôles n=9, RC : animaux sous restriction calorique n=9 et RSV : animaux supplémentés en resvératrol n=9. Les ordonnées à l'origine de chacune des courbes de mortalité représentent les taux de mortalité de base pour chaque groupe, et la pente des droites de régression représente la « dynamique » des taux de mortalité.*

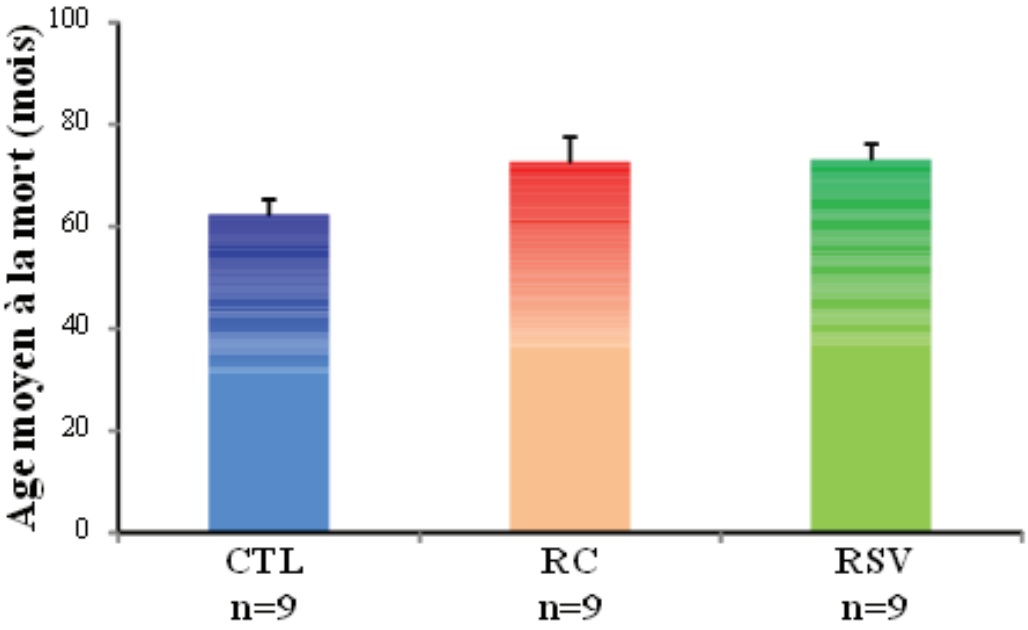


Figure 2. *Age moyen à la mort (en mois) pour chaque groupe d'animaux CTL : animaux contrôles n=9, RC : animaux sous restriction calorique n=9 et RSV : animaux supplémentés en resvératrol n=9. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.*

Les causes de mortalité ont été évaluées pour chaque groupe (Figure 3). Sans faire la différence entre les causes de mortalité associées à l'âge et celles qui ne le sont pas, les animaux CTL présentent un large panel de causes de mort. Chez les animaux traités, les causes de mortalité sont moins variées et la majorité des animaux sont morts de néphrites aigues (crise d'urémie) concernant 4 individus chez les restreints et 5 individus chez les microcèbes supplémentés en RSV. Enfin lorsque les causes de la mort étaient liées à l'âge nous avons représenté graphiquement la fréquence d'apparition de ces perturbations selon une échelle chronologique (Figure 4). La diurèse peut-être considérée comme un marqueur de suivi de l'état de santé chez les animaux captifs. Ici, nous montrons que ce paramètre varie significativement en fonction du traitement. Les animaux supplémentés en RSV présentent une diurèse plus élevée que ce soit le jour (récupérateurs placés à 12h, urines récupérée à 16h) ou la nuit (récupérateur placés à 16h et urines récupérées à 9h le lendemain matin) (Figure 5).

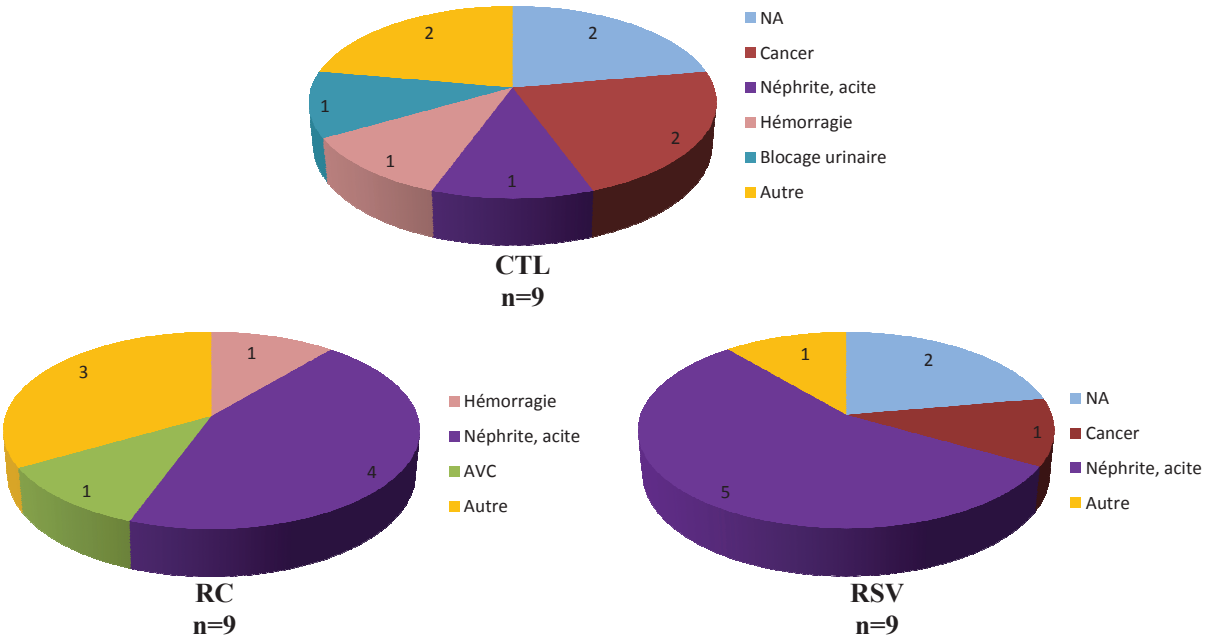


Figure 3. *Causes de la mort pour chaque groupe d'animaux CTL : animaux contrôles n=9, RC : animaux sous restriction calorique n=9 et RSV : animaux supplémentés en resvératrol n=9. NA : cause non définie (pas de nécropsie), Autre : absence de cause (observations visuelles). Les chiffres dans chaque part représentent le nombre d'animaux présentant cette cause de mort.*

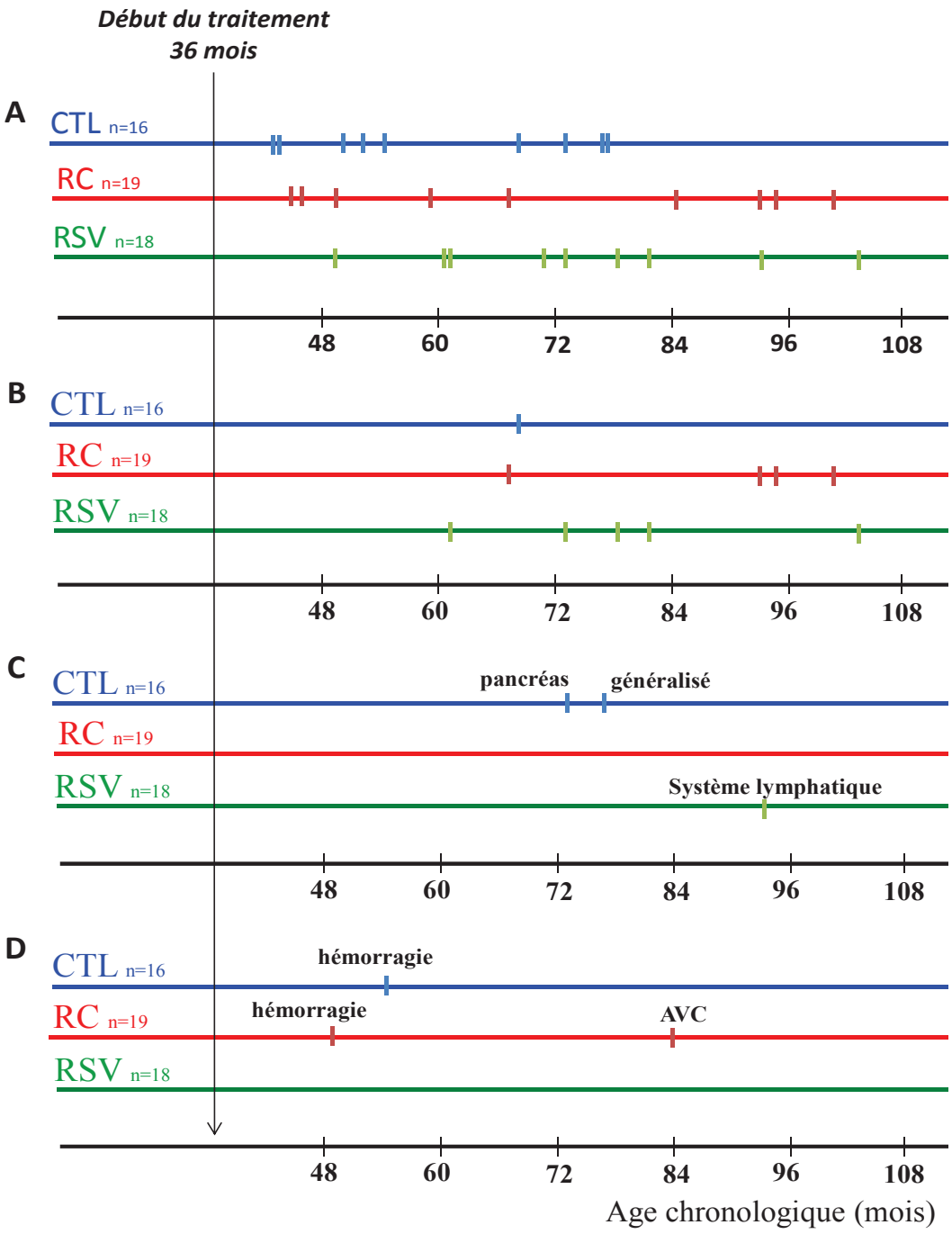


Figure 4. *Représentations chronologiques des causes de la mort pour chaque groupe d'animaux CTL : animaux contrôles n=9, RC : animaux sous restriction calorique n=9 et RSV : animaux supplémentés en resvératrol n=9. En A : représentation chronologique de la survenue de la mort (toutes causes confondues), en B : incidences chronologiques des perturbations du système rénale (néphrite aigue, crise d'urémie et ascite), en C : incidences chronologiques des cancers et en D : incidences chronologiques des perturbations du système*

circulatoire et cardiovasculaire. Les autres causes non indiquées dans les graphiques B, C et D ne sont pas considérées comme des causes de mortalité associées à l'âge.

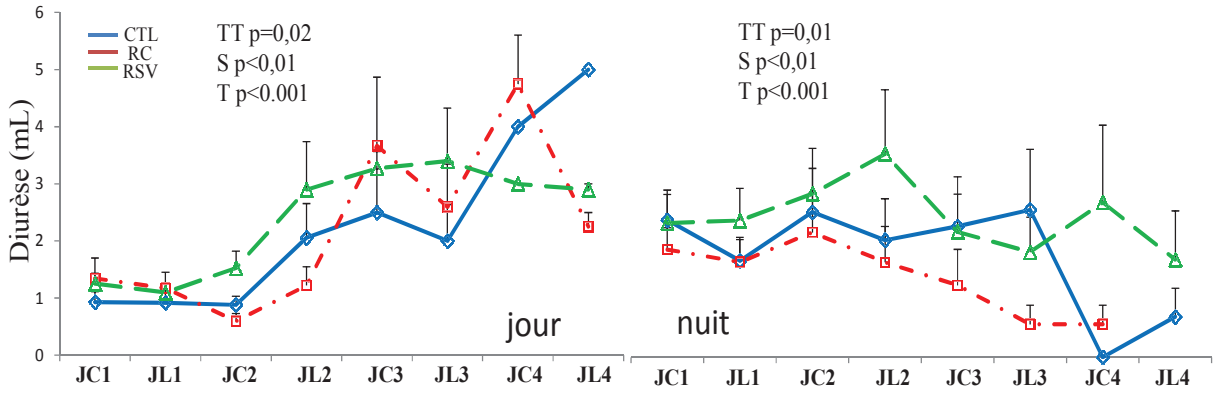


Figure 5. *Evolution de la diurèse (en mL) pour chaque groupe d'animaux CTL : animaux contrôles, RC : animaux sous restriction calorique et RSV : animaux supplémentés en resvératrol. Analyse statistiques par modèles mixtes (fonction LME, logiciel R) ; TT : effet du traitement ; S : effet de la saison et T : effet du temps.*

Discussion

Dans le domaine de la bio-gérontologie, voilà bientôt un siècle que la RC est un protocole couramment étudié chez plusieurs espèces animales pour son effet favorable sur l'espérance de vie et plus récemment pour ses capacités à retarder les pathologies liées à l'âge. Plus récemment, le RSV a été proposé comme mimétique des effets de la RC notamment grâce à ses vertus thérapeutiques « anti-âge » et à son effet potentiel sur la durée de vie, pourtant encore à confirmer chez l'Homme. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de chacun de ces traitements et de comparer les effets du RSV sur le taux de mortalité et l'incidence de pathologies associées à l'âge avec ceux de la RC, encore peu documentés dans la littérature. Les animaux du groupe CTL ont atteint leur temps de « demi-vie » à l'âge de 6,5 ans, c'est-à-dire que 50% de l'effectif de départ a survécu (8 animaux sur 16). L'âge moyen de survie au sein de l'élevage de Brunoy, est pourtant de 5,9 ans chez les mâles (Languille et al., 2012). Cette différence peut s'expliquer en partie par le fait que les animaux du projet RESTRIKAL sont hébergés dans des cages individuelles et sont donc moins soumis aux facteurs de stress développés par les facteurs sociaux et la compétition pour la disponibilité en nourriture. Comparés au groupe CTL, seuls 26,3% (n=5/19) des animaux RC et 33,3% (n=6/18) des animaux supplémentés en RSV étaient morts à 6,5 ans. Il semble

donc que les traitements induisent un effet bénéfique sur la mortalité des microcèbes avant l'âge moyen de survie.

De plus l'âge moyen à la mort chez les animaux traités apparaît décalé dans le temps d'environ 1 an (72,5±7 et 73,1±5 mois respectivement chez les RC et les RSV contre 62,2±5 mois chez les CTL). Ce décalage peut-être rapporté à l'échelle d'âge humaine : 1 an correspondrait à environ une dizaine d'années chez l'Homme, soit 10% de l'espérance de vie. Ces résultats supportent ceux déjà démontrés chez d'autres espèces animales telles que la levure, le nématode et la drosophile, la RC et le RSV induisant une augmentation de la longévité. Cela dit, chez les petits mammifères et les espèces à durée de vie plus importante comme les primates, les évidences sont encore très controversées. Alors que la RC n'a pas augmenté la durée de vie chez certaines lignées de souris de laboratoire (Harrison et Archer, 1987 ; Liao et al., 2010), un apport en RSV n'a pas encore montré un accroissement de la longévité chez les petits mammifères sains et non obèses. En effet, à ce jour le RSV a montré un effet bénéfique sur la mortalité induite par des pathologies telles que l'obésité ou les maladies cardiovasculaires (Agarwal et Baur., 2011). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de résultats comme la dose de RSV administrée, le temps de traitement, le génotype, ou bien encore la composition du régime alimentaire et le pourcentage de RC appliqué.

Nous avons apporté une attention particulière aux différentes causes de mort survenues chez les différents groupes d'animaux. Les pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, certaines maladies neurodégénératives et certains types de cancers ont été associées à l'âge chez les mammifères, dont les primates (Calvanese et al., 2009). Chez le microcèbe, la principale cause de mortalité est la néphrite chronique (Perret, 1982). Alors que chez les animaux CTL, un seul cas a pu être identifié, les animaux traités ont présenté des incidences plus fortes d'insuffisance rénale conduisant à la mort.

Les résultats montrent également que la diurèse est plus élevée en JC qu'en JL. Par ailleurs, alors que la diurèse augmente avec l'âge durant le jour, elle diminue significativement durant la nuit avec l'avancée en âge. L'augmentation de la diurèse chez les RSV est peut-être due à une élimination rénale du resvératrol nécessitant une diurèse plus importante et un taux de filtration glomérulaire également plus élevé. Une activité rénale accrue peut favoriser l'installation d'insuffisance rénale au cours de l'âge ce qui pourrait

expliquer en partie les nombreux cas de néphrite et ascite chez les animaux RSV (la moitié des animaux morts à ce jour).

Conclusion – Chapitre III

Ce dernier chapitre avait pour objectifs d'évaluer, grâce au suivi longitudinal de biomarqueurs (dont certains sont validés comme marqueurs du viellissement chez le microcèbe) le déclin de certaines fonctions de l'organisme qui peuvent survenir au cours de l'âge et la capacité du resvératrol à mimer les effets observés lors d'une restriction calorique modérée.

Les données relatives à la survie et au taux de mortalité indiquent dans un premier temps un ralentissement des taux de vieillissement chez les animaux sous restriction calorique ou supplémentés en resvératrol, résultat renforcé par l'analyse des paramètres physiologiques et comportementaux après 4 ans de traitement. La restriction calorique a induit cependant une baisse générale des niveaux hormonaux sans altérer l'état de santé des animaux. Ceci indique que les microcèbes restreints ont, à moyen et à long terme, mis en place une réponse adaptative à la diminution de leur ressource énergétique en régulant leur balance énergétique au détriment de l'aspect reproducteur par exemple. Le resvératrol entraîne des variations de la balance énergétique vers une augmentation des dépenses énergétiques révélée par une augmentation du métabolisme basal, particulièrement en jours longs. Il semble également favoriser des taux d'hormones sexuelles élevées en jours longs. Les différences observées entre les deux régimes sont probablement dues à des différences de contraintes énergétiques, présentes lors d'une restriction calorique mais inexistantes chez les animaux soumis à un apport chronique en RSV puisqu'ils reçoivent la même quantité de calories que les animaux contrôles.

A partir de ces résultats, les effets hétérogènes des traitements, mais non moins bénéfiques au vue des premiéres données de survie, indiquent que le resvératrol semble pouvoir mimer certains effets de la restriction calorique en contournant les effets délétères (diminution des hormones sexuelles, perte de poids) décrits dans la littérature et qui font de la restriction alimentaire un protocole relativement difficile à appliquer à l'Homme.

Discussion

Synthèse et discussion

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse avait pour objectif d'évaluer l'impact à moyen et à long terme d'une restriction calorique chronique ou d'une supplémentation en resvératrol sur des paramètres d'études physiologiques et comportementaux chez un primate non-humain et visait à répondre aux questions suivantes : (i) modifient-ils les bio-marqueurs du vieillissement chez le microcèbe ? et (ii) ces protocoles induisent-ils un retard d'apparition des pathologies liées à l'âge et allongent-ils la durée de vie chez le microcèbe ?

Un des buts majeurs de la présente étude était d'étudier le potentiel mimétique de la supplémentation en resvératrol à long terme par rapport aux effets bénéfiques obtenus avec la restriction calorique, sans réduire pour autant l'apport calorique.

Les études qui ont été menées dans ce cadre ont permis de démontrer que :

- les **variations saisonnières** (caractéristique du modèle d'étude) des principaux paramètres biologiques étudiés ont été **maintenues** chez les animaux traités, reflet d'une **adaptation** aux différents régimes

- la RC et le RSV ont permis une **amélioration** des perturbations des fonctions physiologiques et métaboliques associées à l'âge observées chez les microcèbes du groupe contrôle telles que la perturbation du **métabolisme glycémique et insulinémique** et l'accumulation de dommages macromoléculaires dus au **stress oxydant**

- d'un point de vue **comportemental**, des effets bénéfiques de la RC et du RSV, bien qu'hétérogènes selon les paramètres concernés, ont pu être mis en avant soutenant le rôle de la nutrition dans le cadre du **vieillissement cérébral** et des déclins cognitifs et moteurs associés à l'âge

- à long terme, la RC et le RSV ont induit des variations bénéfiques de certains **bio-marqueurs** propres à la **balance énergétique** et à la fonction **endocrine** connues pour être fortement impliqués dans la régulation des processus du vieillissement

- la RC et le RSV ont également démontré un effet **positif** au niveau de la **durée de vie** chez les microcèbes.

Cette discussion a pour but d'intégrer et de replacer les résultats obtenus à moyen et long-terme dans le cadre des questions soulevées aujourd'hui par la thématique du vieillissement et la mise en place de stratégies « anti-âge » pour de futures mais non moins proches potentielles applications à l'Homme.

L'une des originalités de l'étude est le suivi « synchrone » de l'impact d'une RC ou de l'apport en RSVchez un modèle unique d'étude du vieillissement. Dans un premier temps une synthèse des effets démontrés sous restriction calorique sera dressée, comme l'emploi chronique de ce protocole représente la première étude de ce genre chez le microcèbe. Dans un deuxième temps, le « pouvoir » mimétique du resvératrol sera discuté en comparant ses effets à ceux de la restriction calorique. Nous discuterons également des limites que peut engendrer une étude longitudinale et des résultats en prenant en compte des traits d'histoire de vie des microcèbes en milieu naturel, à savoir une exposition au fluctuation des substrats énergétiques et la présence/absence de ressources polyphénoliques (dont le resvératrol) dans l'alimentation des microcèbes.

En conclusion nous rappellerons quelles sont les questions en suspend et les évidences majeures de ces travaux. Finalement une ouverture sera faite en proposant des perspectives d'études complémentaires ainsi que le positionnement de ces résultats dans la Recherche contemporaine.

I) Bilan des résultats obtenus

Ces travaux s'inscrivent dans la « quête » de la validation de stratégies anti-âge. Depuis les conclusions de l'étude de McCay et ses collègues (1935) sur la RC chez les rongeurs, plusieurs études ont vu le jour chez de nombreuses autres espèces animales, révélant des effets similaires sur la longévité, associés à un retard d'apparition de pathologies liées à l'âge et au maintien des fonctions biologiques de l'organisme. Depuis, l'intérêt porté pour la restriction calorique et ses mécanismes ne cesse de croître, ainsi que les recherches de mimétiques de la RC et de stratégies nutritionnelles bienfaisantes.

Une recherche des publications et des revues sur Pubmed incluant les termes « dietary » ou « calorie/caloric » et « restriction » à partir de 1935 jusqu'à aujourd'hui (2011) et comparés aux termes « resveratrol », « anti-aging » et « anti-aging diet » indique une forte croissance de ce type d'études. Le nombre de publications a en effet connu un taux d'accroissement d'environ 50% avec une progression exponentielle, particulièrement concernant la RC et le RSV, même si les études sur le RSV sont encore récentes dans le domaine de la bio-gérontologie (Figure 1). Nos travaux répondent donc à une véritable demande « dynamique » et croissante dans le domaine du vieillissement, de la bio-gérontologie et de la médecine anti-âge.

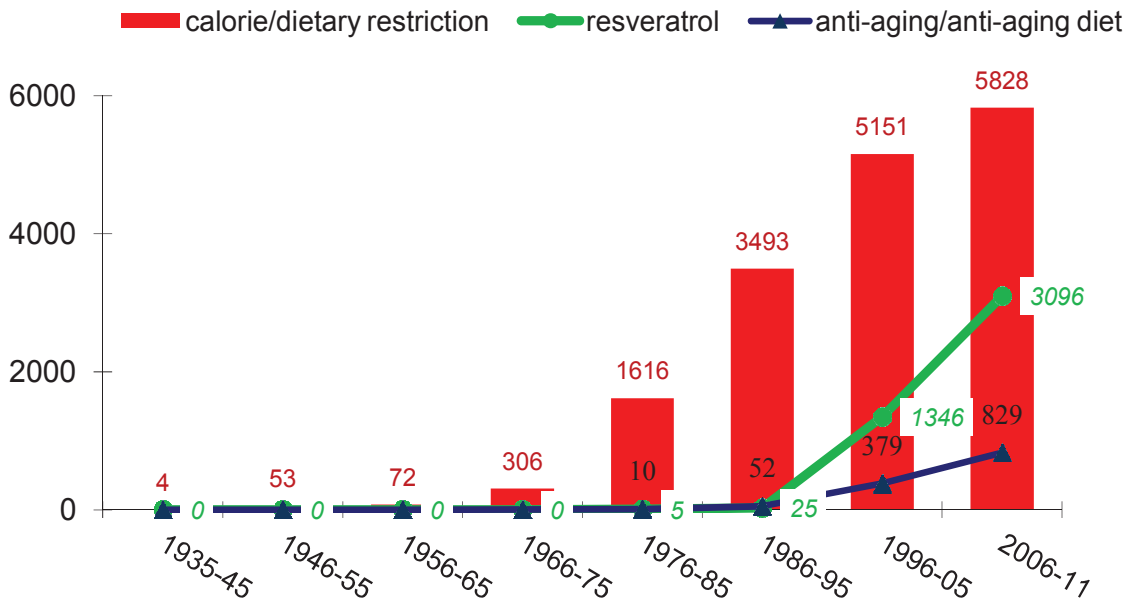


Figure 1. *Evolution des publications (articles et revues) de 1935 à aujourd'hui concernant la restriction calorique, le resvératrol et les interventions nutritionnelles anti-âge. (Source Pubmed 2012).*

1) Adaptation aux différents traitements

Les traitements ayant commencé à l'âge adulte (3 ans), une des premières évidences à rappeler est l'adaptation des animaux à la restriction calorique et à la supplémentation alimentaire en resvératrol. A court terme cette adaptation cruciale aux modulations du régime standard a pu être mise en évidence après un an de traitement (Dal-Pan et al., 2011). Malgré

certaines variations des composantes de la balance énergétique et hormonale, l'évolution des différents paramètres physiologiques des animaux traités a suivi l'entraînement photopériodique (alternance de jours courts et de jours longs) de façon comparable aux animaux contrôles. De manière intéressante, cette adaptation a perduré au cours du temps, sans altération évidente des rythmes saisonniers chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôles après 4 ans d'étude. Ceci reflète la mise en place de stratégies d'adaptations physiologiques aux différents régimes à long terme chez cette espèce. La nature de ces stratégies ainsi que les hypothèses probables concernant une telle plasticité phénotypique seront discutées dans les paragraphes suivants en fonction de la nature des traitements.

2) Résumé des principaux résultats

Les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 1, par étude et par durée de traitement. Chez les microcèbes CTL, les caractères phénotypiques observables du vieillissement sont apparus au cours de l'avancée en âge, notamment un blanchiment manifeste de la fourrure (**étude 7**). Des perturbations de l'homéostasie glycémique et insulinémique après un challenge glucosé (**étude 1**) ainsi qu'une accumulation de dommages cellulaires ont pu être observées (**étude 2**). De même un déclin de certaines fonctions cognitives et motrices est ressorti avec l'avancée en âge chez ces animaux (**études 4 et 5**). Ces résultats appuient l'utilisation du microcèbe comme modèle d'étude pertinent pour la recherche sur le vieillissement. D'autres paramètres tels que la testostérone ou l'activité locomotrice spontanée n'ont pas été affectés par l'âge (**étude 7**), nous pouvons donc penser que certaines fonctions de l'organisme sont plus sensibles au vieillissement que d'autres et le déclin lié à l'âge pourrait apparaître plus tardivement chez le microcèbe, après l'âge de 8 ans.
De manière générale, la restriction calorique et le resvératrol ont entraîné des variations des différents marqueurs physiologiques concernant l'état de santé des animaux, et ce à moyen terme, après deux/trois ans de traitements. En effet, la RC et le RSV ont permis une amélioration de la sensibilité à l'insuline (**étude 1**) et ont limité l'accumulation de certains marqueurs du stress oxydant (**étude 2**). A plus long terme, alors que la RC n'a pas induit de variations des capacités cognitives, elle améliore l'anxiété et les performances motrices ainsi que l'activité locomotrice spontanée (**études 4 et 5**). Le RSV a révélé une amélioration de la mémoire de travail, ainsi qu'une diminution de l'anxiété, mais les performances motrices sont restées inchangées (**études 4 et 5**). Cependant, la restriction calorique et le resvératrol ont eu

des effets hétérogènes au niveau de la balance énergétique et de la fonction endocrine (**étude 7**). Les contraintes énergétiques engendrées par la restriction calorique ont entraîné une diminution de la masse corporelle mais n'ont pas perturbé les dépenses énergétiques ce qui laisse entendre que les animaux restreints se sont adaptés à long terme en ajustant leur balance énergétique certainement par modulation des phases de torpeurs quotidiennes (caractéristique physiologique du microcèbe). Les taux d'IGF-1 et de testostérone ont également été abaissés suggérant à la fois le rôle probable de l'axe IGF-1/insuline (**études 1 et 7**) lors de la régulation métabolique chez les organismes restreints, un mécanisme conservé au cours de l'évolution et appuyant également l'hypothèse du compromis d'investissement d'énergie entre reproduction et survie. Le resvératrol a entraîné un maintien de la masse corporelle, affectée par l'âge chez les animaux contrôles et a augmenté les dépenses énergétiques, particulièrement durant les jours longs. Le profil endocrinien des animaux supplémentés a subi des modifications contrastées. Alors que les concentrations d'IGF-1 n'ont été ni augmentées ni diminuées par le RSV, les niveaux de testostérone ont été amplifiés de manière significative durant la période de jours longs. Finalement les données actuelles de survie sont prometteuses puisque, alors que moins de 50% de l'effectif de départ des animaux CTL a survécu, plus de 50% des animaux RC et plus de 50% des animaux RSV sont encore vivants et présentent de surcroît un âge moyen à la mort plus élevé d'environ 1 an par rapport aux CTL (**études 7 et 8**).

Tableau 1. *Résumé des résultats principaux des travaux de thèse.*

Etude	Durée de traitement (années)	Age (années)	Variables d'intérêt	Restriction calorique	Resveratrol
1	2-3 (JL)	5-6	**résitance à l'insuline** (HOMA)	amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline	amélioration de la sensibilité à l'insuline
2	1-2 (JC/JL)	4-5	marqueurs urinaires du **stress oxydant**	pas d'accumulation avec l'âge chronologique	pas d'accumulation avec l'âge chronologique, diminution de certains marqueurs du stress oxydant
3	3-4 (JC/JL)	6-7	marqueurs biochimiques sanguins du **métabolisme hépatique**	diminution du cholestérol total et augmentation de l'activité enzymatique hépatique	augmentation de l'activité enzymatique hépatique
4	4 (fin de JC)	7	**performances cognitives** (mémoire spatiale de travail et de référence, mémoire associative, activité d'exploration)	pas d'altération des performances cognitives, augmentation de l'activité exploratoire	amélioration de la mémoire spatiale de travail, augmentation de l'activité exploratoire
5	4-5 (JC/JL)	7-8	**performances motrices** (détente verticale, endurance), activité locomotrice spontanée, **anxiété** et traits comportementaux	amélioration des performances motrices, diminution de l'anxiété, augmentation de l'activité locomotrice	pas de modification des performances motrices, diminution de l'anxiété
6	4 (JC)	7	**atrophie cérébrale** (ROIs, épaisseur de régions corticales et quantification de LCR)	pas de modification des paramétres de l'atrophie cérébrale	pas de modification des paramétres de l'atrophie cérébrale
7	4 (JC/JL)	7-8	**marqueurs du vieillissement** (IGF-1, masse corporelle, testostérone) **balance énergétique**, **fonction endocrine, survie**	réduction de la masse corporelle, des taux d'IGF-1 et de testostérone, dépenses énergétiques inchangées, activité locomotrice diurne amplifiée	maintien de la masse corporelle, dépenses énergétiques accrues en jours longs, testostérone amplifiée en jours longs
8	4 (JC/JL)	7-8	**taux de mortalité** et causes de mortalité	taux de mortalité freiné, âge moyen à la mort accru, aucun cas de cancer mais néphrites fréquentes	taux de mortalité freiné, âge moyen à la mort accru, diurèse augmentée et néphrites fréquentes

II) Impact de la restriction calorique

1) Effet sur les marqueurs du vieillissement

Après 4 ans de traitement, les microcèbes sous restriction calorique ont présenté une prise alimentaire constante mais sensiblement accrue avec l'âge, consommant la quasi-totalité de leur ration journalière. Au début du projet Restrikal, le pourcentage de RC a été calculé par rapport à la prise alimentaire du groupe contrôle (Dal-Pan et al., 2011) mais la prise alimentaire des CTL a également augmenté avec le temps, les animaux ne consommant pas toute leur ration alimentaire au départ. De ce fait le pourcentage de restriction calorique a été en de ça de ce qui était attendu, théoriquement : 30%, atteignant tout de même les 26% en 4ème année. Les microcèbes restreints ont présenté rapidement une diminution de leur masse corporelle, plus importante en jours longs qu'en jours courts en comparaison aux animaux CTL. La perte de poids est l'une des conséquences plus ou moins rapide de la RC, retrouvée chez la plupart des espèces animales. Cependant, même après une longue durée de RC, le métabolisme basal n'a pas été altéré par la diminution de l'apport calorique chez les microcèbes restreints, par contre les niveaux ont diminué avec l'âge, de manière similaire au groupe témoin. Une des théories prédominantes du vieillissement est celle du « rate of living » introduite par Pearl (1928). Longtemps admise comme théorie pertinente, elle supporte le fait qu'à taille et poids comparable, certains organismes vivent plus ou moins longtemps en fonction de leur « taux » de vie, autrement dit en fonction de la façon dont ils régulent l'équilibre entre leur substrat énergétique et leurs dépenses. Cependant cette théorie a été de nombreuses fois réfutée, notamment du fait que certaines espèces, comme les oiseaux ou les chauves-souris, ont un métabolisme élevé présentant paradoxalement des durées de vie élevées (Austad et Fisher, 1991 ; Furness et Speakman, 2008). Ces évidences montrent que la longévité n'est donc pas nécessairement un ajustement entre dépenses énergétiques et ressources énergétiques. Les microcèbes sous RC devraient selon cette théorie présenter des dépenses énergétiques réduites, dont la réduction est au moins égale à la teneur de la restriction, mais ce n'est pas le cas ici puisque ni le métabolisme de repos ni l'activité locomotrice spontanée n'ont été abaissés. Chez des souris soumises à une RC de 20%, le métabolisme basal était abaissé de 24% en moyenne, due à une baisse de l'activité physique totale et considéré comme réponse adaptative d'économie d'énergie (Hambly et Speakman, 2005). Cependant, à l'échelle des organes, les variations du métabolisme basal sont moins importantes ; une des hypothèses est que les animaux sous RC à long terme deviennent

« physiquement et morphologiquement » plus petits. Ainsi pour des animaux soumis à une RC de 30%, la régulation de la balance énergétique s'effectuerait par un amoindrissement des organes d'environ 30%, permettant de diminuer les dépenses énergétiques totales sans pour autant diminuer les taux métaboliques tissulaires. Cette hypothèse est sous débat depuis une trentaine d'année. A savoir, est ce que la RC induit réellement des modifications du métabolisme basal lorsque celui-ci est ajusté pour les variations de la composition corporelle (masse maigre et masse grasse) ? Plusieurs études démontrent qu'il n'existe aucune réduction des dépenses énergétiques chez des animaux RC, lorsque la masse de l'animal est prise en compte (McCarter et al., 1985 ; Yu et al., 1985 ; Speakman et Hambly, 2007).

Une des explications pouvant supporter l'absence de différence entre les sorties de la balance énergétique des animaux CTL et RC serait la mise en place et l'utilisation de stratégies adaptatives d'économie d'énergie en réponse à l'abaissement des ressources alimentaires. La RC est connue pour induire une diminution de la température corporelle (Tc) chez les mammifères, y compris l'Homme (primate non-humain : Lane et al., 1996 ; Homme : Soare et al., 2011). Ce sont Weindruch et ses collègues qui mettent en évidence pour la première fois une diminution de la Tc chez des rats sous RC (Weindruch et al., 1989). Chez le microcèbe, une des caractéristiques physiologiques est l'utilisation de la torpeur, définie comme une hypothermie journalière associée à une réduction du métabolisme et de la Tc en dessous d'un seuil de 33°C. Cette stratégie d'économie d'énergie est particulièrement sollicitée lors d'une RC. En effet, l'impact d'une RC modérée de 11 semaines a été comparé à celui d'une RC aigue de 80% pendant 2 semaines ; les résultats montrent que plus la RC est importante et plus la torpeur gagne en profondeur et durée, ainsi que la température minimale atteinte (Canale et al., 2010). Au cours du projet Restrikal, la température corporelle a été suivie, à l'aide de la thermographie à infra-rouge (**Annexe D**) dont les images sont en cours d'analyse ; ainsi nous pourrons définir si les paramètres de la torpeur des animaux sous RC différent de ceux des animaux CTL, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de métabolisme basal et de dépense énergétique. Chez des souris, une RC de 40% induit une entrée en torpeur, rarement observée chez les rongeurs (Rikke et al., 2003). Les hormones du tractus digestif (Gut hormones), telles que la leptine semblent être également impliquées dans la régulation du recours à la torpeur, des données chez la souris suggèrent que la torpeur est induite via des taux faibles de leptine (Gavrilova et al., 1999). De ce fait nous réalisons chez les microcèbes, des mesures de Gut hormones (leptine/ghréline) et nous comptons sur ces résultats pour conforter l'hypothèse du recours accru à la torpeur chez les animaux RC. La diminution de la Tc est selon les chercheurs, un des mécanismes clés sous-jacents à

l'augmentation de la longévité, grâce à son effet inhibiteur sur le développement des tumeurs (Koizumi et al., 1996) et sur le processus de neurodégénération (Salerian et Saleri, 2008). Un des facteurs qui pourrait contribuer à la diminution de la Tc est la réduction concomitante de l'activité physique et locomotrice chez les animaux RC. Cependant nous avons montré que pendant leur phase diurne, les animaux RC présentent plutôt une augmentation significative de leur activité locomotrice, particulièrement marquée en jours-longs, tandis qu'en phase nocturne celle-ci reste semblable à celle des animaux CTL. Cette absence de relation entre la Tc et la quantité d'activité totale a également été observée chez des souris soumises à une RC et provenant de plusieurs lignées différentes (Roth et al., 2002). Une seconde hypothèse d'explication pourrait être la diminution en T4 (tyrosine, hormone thyroïdienne) qui régule le métabolisme et la Tc chez les mammifères endothermes (Daminet et al., 2003 ; Fontana et al., 2006). Une autre hypothèse peut également être considérée, celle de la diminution de la température dégagée lors de la digestion (thermogenèse digestive) qui serait moindre chez les animaux sous RC et qui contribuerait donc à faire diminuer la Tc (Forsum et al., 1981). Ces deux hypothèses pourraient être vérifiées chez les microcèbes du projet en dosant d'une part les niveaux de T4 plasmatiques et en calculant la part des dépenses énergétiques allouée à la thermogenèse digestive, à partir de l'apport énergétique, du métabolisme basal et de l'activité physique, déjà évaluées chez les microcèbes.

La restriction calorique à long terme a également eu un impact sur les marqueurs hormonaux du vieillissement; et particulièrement sur les taux plasmatiques d'IGF-1 et de testostérone. De nombreuses études ont déjà fait état d'une réduction de la circulation d'IGF-1 lors d'une RC (Breese et al., 1991 ; Argentino et al., 2005), ainsi qu'une diminution des taux circulants d'insuline et de glucose, des évidences que nous retrouvons après 2/3 de traitement chez les microcèbes du projet (Marchal et al., 2012). Plusieurs évidences confortent le rôle de la voie de signalisation insuline/IGF-1 dans l'augmentation de la croissance et de la longévité, mécanisme conservé au travers des différents taxons du règne animal (Gontier et Holzenberger, 2010). Les études comparatives menées chez les souches sauvages soumis à une RC et chez des organismes génétiquement modifiés suggèrent notamment le rôle des récepteurs à l'IGF-1/insuline, des mutations au niveau des gènes codant pour ces récepteurs entraînant des effets comparables à une RC, comme un retard des altérations liées à l'âge et une augmentation de la longévité moyenne et maximale chez les invertébrés et les rongeurs (Flurkey et al., 2001; Selman et al., 2008 ; Kenyon, 2011). Toutefois, les mécanismes directs de ce processus ne sont pas encore totalement élucidés et une RC de 30% à long terme chez

l'Homme n'a pas réussi à diminuer les niveaux d'IGF-1 (Fontana et al., 2008). Chez le microcèbe la réduction est apparue rapidement et suggère une modification de cette voie de signalisation conduisant probablement à l'allongement de la durée de vie moyenne constatée chez les animaux RC par rapport au groupe témoin. Ces résultats s'accordent avec la diminution de testostérone observée chez les animaux RC, du à un compromis entre survie et reproduction observé chez d'autres espèces, comme le stipulent certaines théories du vieillissement; minimiser les fonctions de reproduction limite les dépenses d'énergie alors redirigée vers un maintien du « soma », ce qui conduirait à un allongement de la durée de vie (Nelson et al., 1995 ; Brecchia et al., 2006 ; Holliday, 2006). De même, il existe des preuves du contrôle des fonctions de l'hypophyse et des gonades par l'IGF-1 ; les animaux ayant une sécrétion d'IGF-1 altérée, présentant des sécrétions gonadotropes et androgènes altérées (Ramaley et Phares, 1980 ; Baker et al., 1996). Nous pouvons penser que la réduction d'IGF-1 chez les microcèbes RC a également joué un rôle dans la diminution des hormones sexuelles.

L'activité physique des microcèbes restreints a été augmentée durant la période diurne. Cela s'est remarqué à la fois par l'activité locomotrice spontanée enregistrée en continu mais également à la suite des observations comportementales effectuées dans leurs propres cages. A long terme la RC induit probablement une augmentation des comportements de recherche alimentaire coïncidant avec l'heure du nourrissage. Cette anticipation est principalement visible lors de la saison de jours longs, témoignant d'une sensibilité énergétique accrue du microcèbe pendant cette période, certainement en raison de réserves énergétiques moins importantes. Les animaux restreints ont cependant présenté des performances accrues lors des épreuves de saut et d'endurance. Il est avéré que la RC a un effet bénéfique et protecteur sur la composition des tissus musculaires et en particulier sur le nombre et la qualité des fibres musculaires chez les rongeurs vieillissants (Aspnes et al., 1997) et chez les macaques rhésus (Colman et al., 2008). Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'amélioration des performances cognitives affectées par l'âge chez les animaux restreints comme la mémoire spatiale de référence ou bien l'activité d'exploration testée dans l'Openfield. Il est néanmoins important de noter que la RC à long terme chez ce primate n'a pas engendré de déficit dans les capacités de mémorisation, comme cela a parfois été observé à moyen terme chez les rats (Ingram et al, 1987; Pitsikas et al, 1990, Yanai et al., 1994). Une des explications les plus parcimonieuse peut être que l'abaissement des ressources énergétiques dont le glucose, aussi bénéfique soit-il concernant la régulation métabolique, peut altérer à long terme le substrat et

les réserves métaboliques essentielles du système nerveux central. Une des hypothèses émises quant à un effet protecteur de la RC est la voie de signalisation de la sirtuine SIRT1 (Agarwal et Baur., 2011), à qui les chercheurs prêtent un rôle essentiel dans les fonctions cognitives et le vieillissement cérébral (Michán et al., 2010). En effet, une absence de SIRT1 serait associée à des capacités cognitives altérées, conséquences d'un dérèglement de la régulation génétique impliquée dans les fonctions synaptiques et la myélinisation des neurones. Le dosage de SIRT1 est envisagé à partir des échantillons biologiques des microcèbes du projet, notamment les tissus du système nerveux central. Les résultats nous permettront potentiellement de mettre en évidence des corrélats entre les quantités de SIRT1 mesurées et les paramètres d'étude du projet. Les études chez l'Homme sont encore très rares et les résultats restent mitigés (Martin et al., 2007; Mattson, 2010) soutenant la pertinence des études longitudinales menées auprès des primates non-humains comme le microcèbe.

2) Retard d'apparition d'altérations physiologiques associées à l'âge et survie

Dès deux ans de traitement, les microcèbes restreints ont présenté une amélioration de la résistance à l'insuline et le suivi de la cinétique glycémique après un challenge glucosé (hyperglycémie provoquée orale) démontre également une amélioration de la tolérance au glucose. Nos résultats concordent avec ceux trouvés chez les rongeurs (Barzilai et al., 1998 ; Bowman et al., 2010) et chez les macaques rhésus sous RC (Lane et al., 1995, Rezzi et al., 2009 ; Colman et al., 2009) soumis à une restriction de 30%. Le tissu adipeux blanc jouant un rôle crucial dans les perturbations métaboliques associées à l'âge (Catalano et al., 2005), des mesures morphologiques ont été réalisées chez les microcèbes, comprenant les circonférences supérieures et inférieures de l'abdomen. Comparés aux animaux CTL, les RC présentaient des tours centimétriques inférieurs de ces parties du corps (données non montrées). Des analyses ultérieures sur les tissus conservés des animaux du projet pourront permettre d'évaluer la quantité de tissus adipeux au niveau de l'abdomen, notamment le tissu adipeux mésentérique (repli du péritoine reliant les intestins), connus pour son rôle dans l'inflammation et la sécrétion de TNF-α facteur de risque dans le développement de diabète de type II (Illouz et al., 2008 ; Sam et al., 2009). La RC a également diminué les taux de cholestérol total sanguins, en faveur d'une régulation métabolique bénéfique. Il aurait été pertinent de mesurer également les taux d'HDL, de LDL et de TG qui auraient permis d'affiner nos conclusions quant à un retard d'apparitions de troubles métaboliques chez les microcèbes vieillissants comme montré chez des souris sous RC (Moura et al., 2012 ; Park et al., 2012 ; Yamaguchi et

al., 2012) et chez le macaque rhésus (Colman et Anderson, 2011). Cependant les microcèbes restreints ont révélé une augmentation de l'ALT, marqueur de l'activité enzymatique hépatique comme chez les macaques rhésus (Colman et Anderson, 2011). Ceci peut être expliqué par le fait que la RC entraîne des modifications importantes de l'activité hépatique comme une amplification des enzymes et ARNm de la gluconéogenèse (Dhahbi et al., 1999).

Chez les microcèbes restreints, une augmentation sensible des marqueurs du stress oxydant a été remarquée après 6 mois de traitement mais cette inflation disparaît avec la durée du traitement (2 ans). De même nous n'avons pas mis en évidence de relation significative entre la quantité de nucléosides oxydés et l'âge chronologique chez les animaux restreints, contrairement aux animaux CTL. À faibles concentrations, les ROS sont primordiaux dans une variété d'activités cellulaires telles que la fonction immunitaire et la vasodilatation (Sohal et Weindruch, 1996), cependant, à des concentrations élevées, ils sont responsables de dommages cellulaires et de l'apparition de pathologies (Gutteridge et Halliwell, 2000). Les effets montrés chez les microcèbes restreints concordent avec la théorie de l'Hormésis, du moins à court terme, indiquant que c'est l'adaptation au stress de faible intensité produit par une RC modérée qui engendre certains de ces effets bénéfiques.

En conclusion, la RC retarde les perturbations physiologiques liées à l'âge chez les microcèbes âgés de 4-5 ans et les animaux restreints se sont adaptés à la RC chronique comme le démontre le maintien des rythmes saisonniers sur l'ensemble des paramètres et sur l'absence de l'augmentation du stress physiologique (cortisol) à long terme. Nos résultats sont conformes aux résultats rapportés dans la littérature suggérant que la RC améliore l'homéostasie via la perte de masse corporelle, régulant ainsi un large spectre de processus métaboliques, à l'origine du retard d'apparition de pathologies associées à l'âge et de l'accroissement de la longévité chez le microcèbe. En effet les résultats obtenus concernant la durée de vie moyenne chez les animaux restreints sont fortement encourageants pour la suite du projet. Les causes de mortalité ont également différé par rapport aux CTL, les animaux RC ne présentant aucun cas de néoplasie ou de cancer. Quand l'effectif des animaux morts sera suffisant, des analyses de survie seront entreprises pour déterminer si les résultats optimistes d'aujourd'hui seront significatifs et si la longévité maximale sera également accrue. Nous pourrons également évaluer si débuter la RC à l'âge adulte chez le microcèbe est suffisant pour obtenir un accroissement de la durée de vie puisqu'il semblerait, qu'au delà du pourcentage de RC, le moment auquel débute la restriction est décisif. Plus la RC est

commencée tardivement et plus les effets bénéfiques attendus notamment concernant la longévité sont amoindris (Weindruch et al., 1982).

III) Le resvératrol : mimétique de la RC chez ce primate ?

1) L'action mimétique du résveratrol : oui…

La supplémentation en resvératrol semble pouvoir reproduire certains effets bénéfiques obtenus lors d'une restriction calorique chronique de 30% chez le microcèbe. Ces effets « mimétiques » ont été révélés concernant le retard d'apparition de pathologies liées à l'âge et l'allongement de la durée de vie moyenne. Une amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'absence d'une accumulation des dommages du matériel génétique à moyen terme ont été démontrées chez les animaux traités avec le RSV de manière comparable aux résultats obtenus chez les animaux restreints. Le resvératrol est donc capable, bien que la quantité de calories ingérées soit semblable à celle des animaux CTL, de réguler l'homéostasie glycémique et insulinémique de maniére favorable. Une étude menée chez l'Homme a d'ailleurs montré un potentiel prometteur du RSV sur la prévention du diabète de type II, révélant une réduction significative des concentrations plasmatiques de glucose et d'insuline à jeun et postprandiales (Elliott et al., 2009). Le resvératrol a également démontré son action antioxydante en abaissant les niveaux de nucléosides endommagés dans les urines des microcèbes avec le temps et, comme chez les animaux restreints, la quantité de nucléosides oxydés n'a pas présenté de relation positive avec l'âge chronologique contrairement aux animaux du groupe contrôle. Ces résultats démontrent l'action antioxydante propre à ce polyphénol naturel et largement décrit dans la littérature. Cependant nous pouvons penser que, malgré des résultats semblables pour les marqueurs du stress oxydant pour les deux régimes, les mécanismes sous-jacents soient différents, l'action « antioxydante » de la RC reposant plus sur une régulation du métabolisme (notamment régulation de l'axe insuline/IGF-1) minimisant l'accumulation des déchets anaboliques cellulaires favorables à la production de ROS. Par ailleurs, le resvératrol a approché les effets positifs de la RC au regard des performances motrices des microcèbes, montrant qu'en l'absence d'une baisse de la masse corporelle, les performances motrices peuvent être améliorées via une action du RSV sur les cellules du tissu musculaire et également sur la biogénèse mitochondriale de ce tissu. Nous avons également montré que l'anxiété des microcèbes supplémentés a été abaissée tout comme celle des animaux restreints et les taux de

cortisol des animaux du groupe RSV n'ont pas été altérés par le traitement démontrant une adaptation des animaux à leur régime, comme pour les RC.

L'effet mimétique le plus marqué de ces travaux repose sur les données de survie après 4 ans de traitement. En effet, le resvératrol a permis un retard du taux de mortalité chez les animaux traités, particulièrement marqué avant l'âge de demi-vie, de 5,9 ans chez les microcèbes mâles en captivité. Cependant, à part chez les souris soumises à un régime riche en calories, au cours duquel le resvératrol a permis d'augmenter leur longévité (Baur et al., 2006), une étude plus récente a montré que malgré certains effets mimétiques du resvératrol par rapport à la RC, ni la durée de vie moyenne ni la longévité maximum n'ont été améliorées chez des souris non-obèses (Pearson et al., 2008).

2) …et non. Les différences observées

La majorité des effets observés chez les microcèbes traités avec du RSV s'est révélée différente de ceux observés chez les animaux sous RC. Les paramètres métaboliques ont été affectés par le RSV sans que pour autant ces changements soient similaires à ceux observés lors de la RC. Les animaux du groupe RSV ont montré un maintien de leur masse corporelle, que ce soit en jours courts ou en jours longs comparé à la masse corporelle des CTL qui dès l'âge de six ans diminue, de manière marquée en période de jours courts. Le poids des animaux RSV n'a pas été diminué comme chez les animaux restreints, une des explications majeures provenant du fait que les calories ingérées des RSV étaient les mêmes que celles des CTL. Pourtant certaines études démontrent que des fortes doses de resvératrol engendrent une réduction de la masse corporelle chez des souris obèses (Lagouge et al., 2006). D'ailleurs des travaux chez le microcèbes avaient reporté une diminution de la prise alimentaire ainsi que diminution de la masse corporelle chez des microcèbes supplémentés avec une dose de 20mg.jour^{-1} pendant un mois (Dal-Pan et al., 2010). Cependant la diminution de la masse corporelle ne semble pas être un facteur « direct » de l'accroissement de la longévité. En effet, des études chez la souris montrent que des périodes intermittentes de jeun n'engendrent aucune modification du poids alors qu'elles procurent une augmentation de la longévité de ces souris (Anson et al., 2003). De plus il a été suggéré, chez les rongeurs, que les individus qui présentent l'amplitude de variation de masse grasse la moins importante lors d'une restriction calorique sont ceux qui vivent le plus longtemps (Bertrand et al., 1980). De faibles doses de RSV ont même démontré une prolongation de la durée de vie chez des souris supplémentées tout en augmentant simultanément la masse corporelle (Pearson et al., 2008).

Les microcèbes traités avec du RSV ont également augmenté leur dépenses énergétiques durant la période de jours longs, contrairement aux animaux RC, au vue de l'augmentation de leur métabolisme basal, même quand celui-ci est ajusté pour les variations de masse corporelle. Cette évidence avait déjà été observée après un an de traitement (Dal-Pan et al., 2011), montrant que le RSV est capable d'induire rapidement une régulation de la balance énergétique pouvant influencer le gain de masse corporelle comme cela à été montré chez des microcèbes supplémentés avec 200 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ indiquant que le resvératrol pourrait avoir le pouvoir d'améliorer la dépense énergétique favorisant ainsi la perte de poids même lors d'un régime standard (Dal-Pan et al., 2010 ; Dal-Pan et al., 2011). Cependant nous n'avons pas observé de différences au niveau de l'activité locomotrice chez les microcèbes au cours de la période de traitement. Ceci peut-être expliqué par des stratégies d'économie d'énergie différentes comparées à celles mises en place par les animaux du groupe RC qui ont probablement recours à la torpeur tandis que les animaux RSV diminuent l'utilisation de la torpeur et la profondeur de celle-ci, économisant peut-être sur l'activité locomotrice spontanée (Dal-Pan et al., 2010 ; **Annexe D**).

Le RSV a également eu des effets différents concernant le métabolisme hépatique, aucune amélioration du taux de cholestérol total n'a été observée contrairement aux animaux restreints mais une modification de l'activité enzymatique a été révélée avec une augmentation des alcalines phosphatases circulantes. Tout comme la RC, le RSV induit certainement des modifications de l'activité hépatique comme en témoigne l'activité enzymatique de l'ALP, enzyme impliquée notamment dans la minéralisation osseuse, mais le RSV n'a pas entraîné de diminution du cholestérol. La régulation du métabolisme lipidique dépendant fortement de la saisonnalité chez le microcèbe, il se peut que le RSV n'est pas pu agir sur les taux de cholestérol totaux au vu d'un maintien de la masse corporelle chez les animaux RSV qui sont nourris *ad libitum*. Le suivi des marqueurs hépatiques nous a cependant permis de souligner le fait que le RSV ne semble pas présenter de toxicité à la dose de 200 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ chez le microcèbe au vue des concentrations inchangées de bilirubine et d'albumine. Récemment, une étude a montré que les marqueurs protéiques hépatique étaient perturbés sous de forte dose de RSV 1000-2000 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ chez l'Homme avec une augmentation significative de la bilirubine et des concentrations de potassium (LaPorte et al., 2010).

Alors que les animaux sous RC ont présenté des taux d'IGF-1 et de testostérone abaissés, les animaux RSV ont présenté des concentrations plasmatiques d'IGF-1 similaires à celles des animaux du groupe contrôle, avec tout de même un déclin au cours de l'âge. Ceci

est paradoxal, avec le fait que des taux d'IGF-1 réduit sont associés à un retard des pathologies liées à l'âge et à l'allongement de la durée de vie et ne concorde pas non plus avec l'augmentation de l'âge moyen à la mort chez les animaux RSV de presque un an comparé aux CTL. Néanmoins, la littérature suggère fortement que le RSV agit sur les taux d'IGF-1 circulants. En effet, la dose de 22,5 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ de RSV administrée dans l'étude de Baur et ses collègues a induit une diminution des niveaux circulant d'IGF-1 (Baur et al., 2006). Récemment, une étude *in vitro* a montré que le RSV a la capacité de ralentir la croissance des cellules cancéreuses via une inhibition de l'action de l'IGF-1 et de ses récepteurs IGF-1R sur ces cellules (Vanamala et al., 2010). Contrairement à l'absence d'effet sur l'IGF-1, les taux de testostérone ont néanmoins été amplifiés chez les microcèbes supplémentés en RSV contrairement aux animaux restreints, particulièrement pendant la saison de reproduction. Il peut s'agir d'un décalage dans le temps du pic maximum de cette hormone ou bien d'une modulation quantitative des taux de testostérone générée directement ou indirectement par le RSV. Les animaux traités avec le RSV, n'ont pas de compromis à faire entre reproduction et survie et de surcroit le RSV semble être un promoteur de la testostérone circulante comme montré chez les rongeurs (Juan et al., 2005). L'administration quotidienne de RSV aurait une action stimulatrice de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, sans induire d'effets indésirables sur le reste du métabolisme, suggérant un mode d'action opposé à celui de la restriction calorique du moins concernant le système endocrinien.

Finalement, alors que la RC n'a pas montré d'altération ni d'amélioration au niveau des performances cognitives, le RSV a révélé un effet bénéfique, à partir de 6 mois de traitement, sur la mémoire spatiale de travail. Ces évidences montrent d'une part que les effets mimétiques du RSV sont modulés en fonction de la durée du traitement puisque nos travaux précédemment publiés montrent d'avantage d'effets partagés entre la RC et le RSV après 1 et 2 ans de traitement (Dal-Pan et al., 2011a ; Dal-Pan et al., 2011b) et d'autre part que l'impact est hétérogène. Chez des souris adultes le resvératrol a montré une action neuroprotective et a également amélioré les performances cognitives (mémoire spatiale) (Raney et al., 2009 ; Singleton et al., 2010), et il a révélé un maintien des performances cognitives chez des souris âgées en préservant la densité des tissus cérébraux ainsi que du réseau vasculaire cérébral (Oomen et al., 2009). Un des mécanismes serait la diminution du stress oxydant au niveau des tissus cérébraux ainsi qu'une augmentation de la biogénèse mitochondriale (Yousuf et al., 2009). Le RSV a également engendré une augmentation du flux sanguin cérébral, immédiatement après ingestion ce qui favoriserait l'apport en énergie et en oxygène du

cerveau (Lu et al., 2006). Cependant au vu de cet effet intrinsèque du RSV sur la mémoire spatiale nous pouvons également conclure que le RSV est une molécule à large spectre d'action qui de surcroit peut passer la barrière hémato-encéphalique et donc directement agir sur les tissus du système nerveux central, alors que la RC induirait plus une diminution des apports énergétiques nécessaire à la résolution de problème lors des tâches cognitives, qui sont des activités couteuses.

En conclusion, le resvératrol mime les effets bénéfiques de la restriction calorique particulièrement concernant les marqueurs relatifs à la santé des microcèbes. La balance énergétique n'a pas été régulée de la même façon, sans doute par la différence de contrainte imposée par la RC. Finalement le RSV semble préserver au cours du temps des paramètres fortement perturbés par la RC et qui seraient néfastes à long terme chez l'Homme, comme par exemple la masse corporelle, les taux d'hormones et particulièrement la testostérone (voir pour bilan, Figure 2). Ceci nous fait émettre l'hypothèse, que probablement ces deux protocoles ne font pas appel aux mêmes mécanismes, ou du moins pas totalement au vue de l'hétérogénéité des résultats. Dans le paragraphe suivant nous allons tenter de synthétiser les mécanismes qui à l'heure actuelle sont les plus fortement pressentis dans l'action du RSV comme mimétique de la restriction calorique.

Paramètres:	microcèbes sous RC	microcèbes sous RSV
Prise alimentaire	↘	=
Masse corporelle	↘	=
Métabolisme de repos	=	↗ (JL)
Activité locomotrice	↗ (diurne)	=
Tolérance au glucose	↗	↗
Insuline (à jeun)	↘	=
Sensibilité à l'insuline	↗	↗
Act. enzymatique hép.	↗	↗
Cholestérol total	↘	=
IGF-1	↘	=
Testostérone	↘	↗ (JL)
Cortisol	=	=
Performances cognitives	=	↗ (m. travail)
Atrophie cérébrale	=	=
Performances motrices	↗	↗
Anxiété	↘	↘
Mortalité	↘	↘
Age moyen à la mort	↗	↗

Figure 2. *Bilan comparatif des effets d'une restriction calorique ou d'un apport en resvératrol à moyen et à long terme chez le microcèbe. Les fonds rouges représentent les effets mimétiques. JL : jours longs ; m. travail : mémoire de travail.*

3) Vers une harmonisation des mécanismes

Plusieurs interventions capables d'étendre la durée de vie chez plusieurs organismes ont été identifiées, y compris les facteurs environnementaux comme les protocoles nutritionnels, les manipulations génétiques et certaines molécules (médicaments, drogues…). On pense que ces diverses interventions partagent certaines voies de signalisations cellulaires communes, promotrices d'une durée de vie accrue. Bien que les résultats des travaux actuels ne permettent pas encore de conclure sur les mécanismes mis en jeu par la RC et le RSV chez le microcèbe, nous pouvons tenter d'orienter la synthèse vers certains mécanismes en proposant des perspectives d'expérimentation dont certaines sont en cours et qui pourraient compléter nos travaux.

a) L'activation des sirtuines

Des études ont prouvé que la famille des sirtuines (SIRT1-SIRT7) est un ensemble de médiateurs impliqués dans les différents effets principaux de la restriction calorique au cours du vieillissement. Le resvératrol serait également impliqué directement et indirectement dans la régulation extrinsèque de l'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes, deux mécanismes à l'origine de l'abaissement du stress oxydant *in vitro* et *in vivo* (Halliwell et al., 2007). En effet, le resvératrol, par son effet pléiotropique, interagit avec un grand nombre de récepteurs, de kinases, d'enzymes qui ne sont pas encore tous identifiés mais qui pourraient être les acteurs majeurs de ses effets biologiques. L'hypothèse selon laquelle le resvératrol mimerait les effets de la restriction calorique par le biais de l'activation de SIRT1 est apparue en 2003 à partir de l'étude de Howitz et ses collègues (2003). En effet le pouvoir activateur de SIRT1 confèrerait au resvératrol la possibilité de retarder l'apparition de maladies associées à l'âge et de réguler la longévité de la même façon que la RC (Baur et al., 2006 ; Lagouge et al., 2006), comme cela a déjà été prouvé chez la levure (Howitz et al, 2003), le nématode (Wood et al., 2004), la drosophile (Bass et al., 2007) et le poisson (Valenzano et al., 2006). Bien qu'il existe une quantité considérable de données à l'appui de cette hypothèse, des données récentes soulèvent le débat, montrant que Sir2 et accroissement de longévité ne seraient pas liés chez le nématode et la drosophile, la restriction calorique améliorant la durée de vie de ces deux invertébrés indépendamment de Sir2 (Burnett et al., 2011). Actuellement, le rôle du resvératrol dans la chémoprévention et dans l'accroissement de la longévité via l'activation de

la voie des sirtuines n'est pas clair du moins chez les mammifères incluant les primates non-humains et l'Homme (Figure 3).

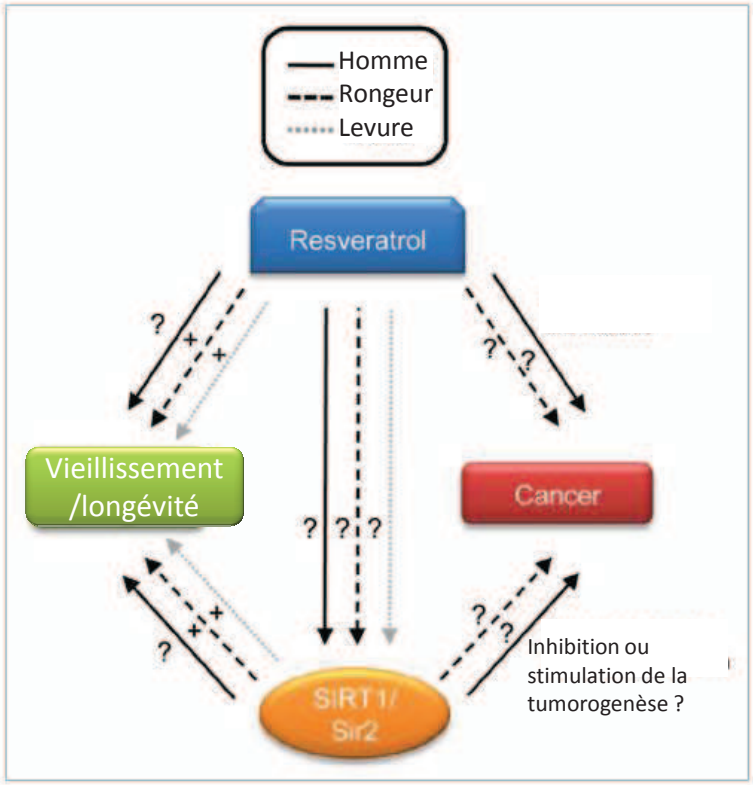


Figure 3. *Représentation schématique de la relation entre le resvératrol, SIRT1, cancer, vieillissement et longévité, étudiée chez plusieurs organismes. + représente des effets positifs, « ? » représente des effets controversés ou inconnus. (Adaptée de Fernandez et Fraga, 2011).*

Cependant en raison de la faible biodisponibilité du RSV, des versions reformulées de ce polyphénol ont été développés telles que resVida (Longevinex®) et SRT501 qui présentent une meilleure disponibilité tissulaire. D'autres molécules sont actuellement en cours de validation pour stimuler les activités de sirtuines de manière plus puissante que le resvératrol (voir pour revue, Villalba et Alcain, 2012).

Chez le microcèbe, le dosage de SIRT1 est envisagé par Western blot et PCR quantitative à partir des échantillons de chaque tissus conservés. Ainsi ces résultats nous permettrons potentiellement de faire le lien entre les effets engendrés par la RC et ceux mimés par le RSV notamment concernant le ralentissement des taux de mortalités chez les animaux traités.

b) La biogénèse mitochondriale

Le resvératrol diffère de la RC par le fait d'avoir une action régulatrice métabolique alors que les ressources énergétiques restent inchangées. Cette modulation métabolique favorable mimant certains effets bénéfiques de la RC, particulièrement dans les cas de pathologies telles que l'obésité ou le diabète de type II, pourrait être due à une action ciblée sur les mitochondries. La biogénèse mitochondriale est susceptible d'être impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire et dans la régulation de l'état « redox » cellulaire. Des perturbations de la biogenèse mitochondriale ont été décrites au cours du vieillissement et dans le cadre de l'apparition de pathologies métaboliques telles que le diabète et le syndrome métabolique et sont donc susceptibles de contribuer à un déséquilibre énergétique cellulaire, au stress oxydatif et à l'altération de certains tissus au cours du vieillissement pathologique. Le resvératrol a montré son action bénéfique sur la biogenèse mitochondriale particulièrement remarquable au niveau du foie (Baur et al., 2006), du système nerveux central (Robb et al., 2008) et des muscles squelettiques (Lagouge et al., 2006). Plusieurs mécanismes (revus dans Ungvari et al., 2011) peuvent expliquer cet effet positif sur la biogénèse mitochondriale et sa contribution au maintien de l'état de santé et des fonctions vitales de l'organisme : (i) l'activation de SIRT1 par le resvératrol pourrait favoriser la déacétylation et l'activation de PGC-1α, molécule clé de la régulation de l'homéostasie mitochondriale, (ii) l'activation de l'AMPK par le resvératrol pourrait stimuler PGC-1α indépendamment de SIRT1, (iii) la modulation de la production d'ATP par le resvératrol agirait directement sur l'anabolisme et le catabolisme cellulaire.

c) La théorie de l'Hormésis

Parce que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans le processus du vieillissement et dans les maladies les plus fréquemment responsables de la mortalité, la recherche d'interventions pouvant limiter le stress oxydant est d'un intérêt considérable. Les nombreuses études sur la RC et le RSV en témoignent, puisque connus pour leur rôle « antioxydant » et protecteur à l'égard de nombreux tissus et organes, induisant un retard d'apparition de pathologies associées à l'âge. La théorie de l'Hormésis a été testée dans plusieurs études sur une grande variété de modèles biologiques que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Les composés phyto-chimiques et provenant de l'alimentation sont les plus étudiés. Parmi

eux, le resvératrol est capable d'activer les voies de signalisation cellulaire de réponse aux facteurs de stress et de protéger certains types de cellules grâce à ses vertus anti-inflammatoires, anti-oxydantes et neuroprotectives (Baur et Sinclair, 2006 ; Chachay et al., 2011). Même si de fortes doses de RSV peuvent être toxiques pour certains types de cellules (Crowell et al., 2004 ; Liontas et Yeger, 2004), de plus en plus de travaux suggèrent que les mécanismes d'action hormétiques des composés phyto-chimiques pourraient être à l'origine de nombreux avantages pour la santé et la longévité (Mattson et al., 2007) (Figure 4).

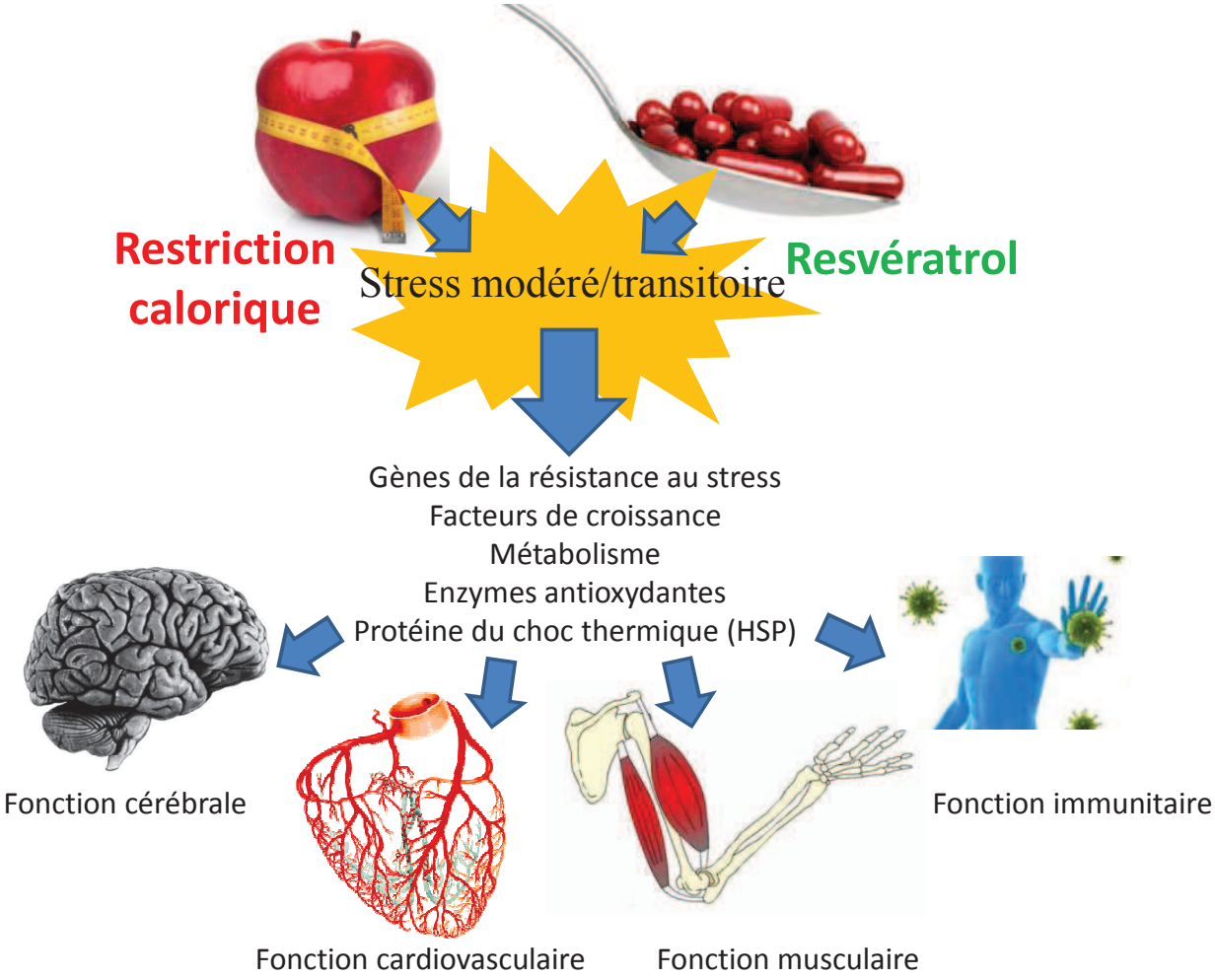


Figure 4. *Représentation schématique de la théorie de l'Hormésis : relation entre les facteurs nutritionnels et les fonctions de l'organisme (Adaptée de Mattson, 2008).*

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces travaux soutiennent certains aspects de cette théorie, précisément ceux relatifs au stress oxydant cellulaire qui semblent

montrer une réponse aux traitements en deux temps avec à court terme, une augmentation des dommages cellulaires causés par le stress oxydant qui disparait avec la durée de traitement.

IV) Les limites de l'étude

Cette partie a pour but de discuter les limites potentielles de mes travaux et de replacer les résultats dans un contexte écologique au regard des traits d'histoire de vie du microcèbe en milieu naturel. Les difficultés liées à l'analyse et à l'interprétation des résultats sont également abordées.

1) Le suivi longitudinal

Les études longitudinales de cohorte offrent la possibilité de suivre un même échantillon d'une population sur une échelle de temps variable pouvant aller jusqu'à la mort des individus. Cependant cette approche d'étude peut également présenter des inconvénients dans le cadre du vieillissement. La variabilité inter-individuelle est une limite majeure lorsque l'on étudie des caractéristiques d'êtres vivants sur le long terme. McCleery et al. (2008) ont montré que le « statut » individuel interagit avec l'avancée en âge et impacte les « parcours » de vieillissement. Dans notre cas, si les animaux qui présentent les moins grandes variations au niveau des marqueurs du vieillissement sont également ceux qui vivent le plus longtemps, alors leurs valeurs peuvent alors minimiser l'effet de l'âge attendu au sein de l'échantillon lors de l'analyse statistique. Avec le temps, les « mauvais » animaux vieillissants disparaissent en faveur des « bons » animaux âgés qui vivent potentiellement plus longtemps, introduisant ainsi un biais dans l'estimation des phénotypes propres au vieillissement. Ceci est aisément contournable en ne gardant que les individus qui ont vécu tout au long de l'étude et en effectuant une analyse de variance (ANOVA sur mesures répétées) sur l'ensemble des mesures répétées. Cependant, notre étude, menée sur un primate, ne nous permet pas de réaliser ce genre d'analyse de manière robuste au vue des effectifs restreints après 4 ou 5 ans de traitement.

De même les conditions d'élevage des animaux, particulièrement périnatales et durant la croissance, pourraient engendrer des effets « cohorte », responsables de « patrons » de vieillissement propres à l'ontogénèse individuelle et qui peuvent persister au cours du temps (Gaillard et al., 2003). Le déclin lié à l'âge d'un paramètre d'étude est susceptible d'être masqué si, (avant le début des traitements) ce paramètre présentait des valeurs initiales

relativement faibles ou au contraire anormalement élevées par rapport au reste de la population. Un des moyens pour remédier à ce problème serait de prendre en compte la variabilité inter-individuelle comme variable aléatoire au cours du temps lors de la construction des modèles statistiques.

Une autre limite de notre étude pourrait provenir du fait que les microcèbes soient isolés socialement, et n'ont donc pas la possibilité de se reproduire. Cependant il a été montré que la l'expérience de reproduction est directement liée à la régulation des processus du vieillissement (Holliday et al., 2006). Bien que les animaux soient tous dans les mêmes conditions d'isolement social, il est possible qu'à terme, l'absence de compromis entre reproduction et survie interfère sur les « patrons » de vieillissement des microcèbes et ce potentiellement de façon différente en fonction des traitements.

2) Pertinence de la RC et du RSV chez le microcèbe

Il est important de faire le point ici sur la pertinence de tels protocoles chez le microcèbe. Bien qu'appartenant aux primates, ce petit mammifère hétérotherme présente un métabolisme particulier. En effet il est capable d'abandonner le maintien de sa température corporelle pour entrer en torpeur. Sa balance énergétique et sa fonction endocrinienne sont entrainées par la variation saisonnière de la photopériode. De plus le microcèbe est une espèce endémique à Madagascar, île soumise à l'influence de l'oscillation climatique australe (ENSO) (Schmid, 2001) affectée par les événements El Niño et La Niña imposant des périodes de sécheresses et d'inondations (Deward et Richard, 2007). Ces variations climatiques agissent directement sur les disponibilités en ressources énergétiques de la faune malgache. Face à des périodes de faible disponibilité alimentaire, le microcèbe est capable d'ajuster ses mécanismes d'économie d'énergie comme la torpeur et/ou une diminution de l'activité locomotrice au cours de la saison sèche (périodes de jours courts) mais également lors de la saison de reproduction (saison humide, période de jours longs ; Canale et al. 2012), (Canale et al., 2010 ; Terrien et al., 2011). De ce fait, les mécanismes spécifiques physiologiques du microcèbe en réponse à de telles variations lui permettent d'amplifier ses chances de survie et son succès reproducteur (Canale et al., 2012). Le pourcentage de restriction « calorique » induit par cette diminution de disponibilité alimentaire inter- et intra-annuelle est difficilement quantifiable en nature (Dammhahn et Kappeler, 2008) et n'est pas clairement décrit dans la littérature mais il est évident qu'il varie en amplitude et en durée d'une année sur l'autre. Dans notre étude, nous imposons une restriction calorique chronique

de 30% de longue durée mais dans des conditions d'élevage particulières (température ambiante et hygrométrie stable ; ressource hydrique *ad libitum).* La plasticité phénotypique importante chez cette espèce, c'est-à-dire la capacité d'ajuster la durée et la profondeur de la torpeur en fonction de la disponibilité alimentaire, minimise peut-être les effets attendus de la RC suivant la photopériode artificielle d'exposition.

Concernant l'apport en resvératrol, nous pouvons également replacer nos résultats dans un contexte écologique. Comme exposé dans la partie modèle d'étude, le microcèbe est essentiellement frugivore. De même il a été montré que les Cheirogaleidés, jouent un rôle important dans la dispersion des graines dans les forêts de Madagascar (Ganzhorn et Wright, 1994). Cependant, des observations rapportent que le microcèbe consomme essentiellement la pulpe des fruits, sans consommer les graines surtout quand leur tailles est importantes (Lahann, 2007 ; Dammhahn, données non publiées). A ce jour aucune étude n'a rapporté la quantité de polyphénols et plus spécifiquement de resvératrol consommée par les lémuriens, dont les microcèbes en milieu naturel (Thoren et al., 2011). Il serait intéressant de connaitre ces valeurs pour pouvoir ajuster mais également moduler la dose de resvératrol couramment utilisée chez le microcèbe ($200mg.kg^{-1}.jour^{-1}$) en fonction des saisons (jours longs/jours courts). En effet, il a été montré que le microcèbe se nourrit essentiellement de fruits pendant la période chaude et humide estivale tandis qu'il se nourrit principalement de gommes d'arbres riches en glucides en saison hivernale, ayant pour conséquence de faire varier leurs les apports en polyphénols et donc en resvératrol.

Conclusion et perspectives

1) Questions en suspend

Le projet Restrikal, initialement débuté en 2007 est encore en cours à l'heure actuelle. De même l'intégration des animaux à l'âge adulte s'est faite progressivement, autrement dit, à un instant *t* tous les animaux ne présentent pas des durées de traitement égales. L'analyse de certains paramètres est toujours en cours d'investigation et permettra de répondre à des questions en suspend aujourd'hui. Une des questions est celle de savoir si la restriction calorique et le resvératrol auront un effet sur la durée de vie maximale : la longévité. Nous avons montré un effet favorable sur la durée de vie moyenne et nous nous attendons à un effet bénéfique des traitements sur la longévité des microcèbes soumis au protocole anti-âge comme cela a été démontré chez les modèles invertébrés et rongeurs. Ces résultats seront obtenus dans un futur proche (4 ans), plus rapidement que ceux attendus chez des primates non-humains à durée de vie plus longue comme les macaques rhésus actuellement sous restriction calorique (études au NIA, Baltimore et Université du Wisconsin).

Une deuxième question est d'évaluer quelle est la biodisponibilité du resvératrol chez les microcèbes (**Annexe E**) qui permettrait de définir une dose « thérapeutique » et d'évaluer le métabolisme du resvératrol en fonction des tissus d'intérêt. Chez l'homme, le resvératrol est rapidement absorbé après ingestion, la concentration plasmatique maximale apparaissant autour de 30 minutes après la prise orale (Goldberg et al., 2003). Ainsi 70% en moyenne du resvératrol absorbé se trouve biodisponible chez l'Homme au vu des niveaux qui apparaissent dans le plasma (Walle et al., 2004). Chez le rat la biodisponibilité s'éléve plutôt à 50% (Marier et al., 2004). Chez le microcèbe, le pic plasmatique de resvératrol se situe plutôt autour d'1h après absorption, comme chez la souris (**Annexe E**). Le débat quant à une dose « optimale » à administrer à long terme est toujours vivement alimenté ; les doses utilisées chez les différents modèles d'étude variant largement entre 5mg.kg-1.jour-1 à 1000mg.kg-1.jour-1 (Chachay et al., 2011). Ces quantités sont plus concrètes si on les rapporte par exemple à une consommation de vin rouge chez l'Homme. Si nous prenons par exemple les 20mg de resvératrol quotidiens donnés aux microcèbes et sachant par exemple qu'un pinot noir français (vin qui contient la plus forte concentration de resvératrol) contient environ 5,4mg/l de resvératrol (Stervbo et al., 2006), alors pour un homme de 75kg ceci reviendrait à consommer 2777 litres de vin rouge par jour, une quantité difficilement envisageable.

Cependant le resvératrol existe déjà sous forme de compléments alimentaires (extraits purifiés en gélules) mais les indications sur une dose à respecter ou à ne pas dépasser ne sont pas appuyées par des études précliniques ou cliniques chez l'Homme, nécessitant donc des précautions.

Enfin, les résultats les plus attendus concernent l'évaluation quantitative de marqueurs cellulaires tels que les sirtuines (SIRT1) mais également d'autres acteurs cellulaires qui interviennent dans la régulation du métabolisme comme PGC-1α, AMPc et FOXO1. Les outils moléculaires permettant une telle évaluation sont actuellement en cours de validation pour l'espèce *Microcebus murinus*. L'évaluation de certains marqueurs de l'inflammation (CRP ; interleukines IL-1, IL-6) est également prévue. Ces mesures permettront d'alimenter les évidences déjà obtenues et les hypothèses exposées dans ce manuscrit concernant les mécanismes cellulaires mis en jeu par la restriction calorique ou l'apport à long terme en resvératrol.

2) Perspectives et application(s) potentielle(s) à l'Homme

Les issues révélées au cours de ce projet offrent des perspectives intéressantes axées sur trois points : (i) utilisation du modèle primate non humain *Microcebus murinus* pour les études relatives à la problématique du vieillissement ; (ii) utilisation de protocoles nutritionnels à visée thérapeutique dans le cadre des altérations métaboliques d'une part et dans la maintenance des fonctions de l'organisme et de l'état général de santé d'autre part; (iii) application potentielle et transposition de ces résultats chez l'Homme.

Avec un vieillissement avéré de la population mondiale et une augmentation parallèle de la durée de vie chez les femmes et chez les hommes, les conséquences du vieillissement sont de plus en plus présentes et nécessitent l'intervention de la Recherche et de la bio-gérontologie pour faire face aux désagréments qui peuvent apparaître, à des degrés différents, mais conduisant à une perte d'autonomie et à une vulnérabilité accrues face aux facteurs de stress et au développement de maladies. Même si les effets bénéfiques de la restriction calorique sont nombreux et palpables chez l'Homme, avec les observations conjointes obtenues à partir d'essais randomisés et à partir de données propres à certaines populations comme les habitants d'Okinawa, la restriction alimentaire peut s'avérer difficilement gérable à long terme. Donc l'avenir appartient au développement de composés capables de mimer les effets de la restriction calorique. A l'heure actuelle, le fait qu'il ait été démontré que le vin

rouge contienne des quantités importantes de resvératrol, responsable du French paradox, augmente le potentiel d'application de cette molécule à de larges populations mais les données sur l'administration de resvératrol « isolé » chez l'Homme sont encore minces. Les effets favorables du resvératrol ont largement été démontrés *in vitro,* et ont permis l'identification de plusieurs cibles cellulaires de ce composé. Cependant les études systémiques permettant d'appréhender l'effet pléiotropique du resvératrol dans son ensemble plutôt qu'en faisant la « somme » des différents résultats deviennent cruciales. Un certain nombre d'études cliniques sont actuellement en cours mais les résultats définitifs ne seront disponibles que dans 2 à 5 ans. Récemment en 2010, la « First International Conference on Resveratrol and Health » (www.resveratrol2010.com) a établi un ensemble de recommandations quant à l'utilisation du resvératrol pour l'Homme (revues dans Vang O et al., 2011) (Tableau 2).

<table>
<tr><th colspan="4">Recommandation pour l'utilisation du resvératrol chez l'Homme (Conférence scientifique du Workshop sur le resvératrol et la Santé 2010)</th></tr>
<tr><td colspan="4">E xiste-il des effets secondaires engendrés par une prise réguliére de resvératrol ?</td></tr>
<tr><td colspan="2">Aucune données à ce jour n'a mis en évidence des effets toxiques ou néfastes du RSV</td><td colspan="2">Etude à court terme chez l'Homme (1 mois) a indiqué un inconfort du transit intestinal pour des doses élevées de RSV (2,5 à 5 g/jour)</td></tr>
<tr><td colspan="4">Q uelle est la dose de resvératrol "efficace" conseillée ?</td></tr>
<tr><td>Aucune dose "thérapeutique" n'a encore été fixée chez l'Homme</td><td>Les doses peuvent varier en fonction des effets étudiés et attendus</td><td>Les doses chez les modèles animaux s'étendent de 5 à 2000 mg/jour</td><td>Aucune étude clinique n'indique une dose "efficace" à long terme chez l'Homme</td></tr>
<tr><td colspan="4">Q uels sont les effets potentiels du resvératrol attendus chez l'Homme ?</td></tr>
<tr><td colspan="2">Effet préventif</td><td colspan="2">Effet préventif et curatif</td></tr>
<tr><td colspan="2">Chémoprévention; cancer du côlon; cancer de la peau</td><td>Hypertension; maladies cardiovasculaires</td><td>Résistance à l'insuline; diabètes; syndrôme métabolique; obésité</td></tr>
<tr><td colspan="4">Q uelles sont les avancées attendues au niveau des recherches portant sur le resvératrol ?</td></tr>
<tr><td colspan="2">Etudes pré-cliniques* (traitement chronique) chez modèles animaux particuliérement chez primates non-humains</td><td colspan="2">Etudes cliniques* (traitement aigu et chronique) chez l'Homme</td></tr>
<tr><td>Toxicité et effets secondaires</td><td>Recherche de composés bioactifs synergiques ou antagonistes du RSV</td><td>Biodisponibilité et dégradation du RSV (tissus et organisme)</td><td>Cancers, diabéte de type II et obésité dans le cadre de protocoles thérapeutiques</td></tr>
</table>

Tableau 2. *Recommandations pour l'utilisation du resvératrol chez l'Homme. *avec une formulation chimique du resvératrol comparable entre études précliniques et cliniques. (Adapté de Vang et al., 2011.Workshop group: Systematic review and recommendations on the use of resveratrol).*

En résumé, des études sont encore nécessaires, à la fois *in vitro* et *in vivo* chez les modèles expérimentaux ainsi que chez l'Homme pour répondre aux questions encore en suspend concernant l'application du resvératrol, avec à la clé les mêmes effets bénéfiques que la restriction calorique. Une des conclusions de ces travaux est le maintien, voir

l'amélioration des taux d'hormones circulantes (IGF-1 et testostérone) chez les animaux supplémentés en RSV. Alors que le déclin de la fonction endocrine est l'un des aspects du processus du vieillissement, nous montrons ici que le RSV peut jouer un rôle bénéfique dans la régulation du système endocrinien, comparé aux effets de la restriction calorique qui engendre une diminution rapide des taux d'hormones. Si ces résultats viennent à se confirmer avec la fin du projet, le resvératrol pourrait être envisagé comme molécule à combiner lors de « thérapies » hormonales substitutives déjà utilisées chez l'homme (andropause, ménopause…). Par ailleurs le resvératrol a montré un potentiel quant à l'amélioration de la résistance à l'insuline chez le microcèbe. A l'heure où l'obésité ne cesse de croître, concernant toutes les classes d'âge et de plus en plus les enfants de moins de 10 ans, le resvératrol pourrait être utilisé en prévention pour traiter les troubles du métabolisme et de la balance énergétique. En effet des doses inférieures à 50mg.jour^{-1} sont capables de limiter la prise de poids chez des souris sous régime riche en calories (Cho et al., 2012). De même à court terme, des travaux chez le microcèbe ont démontré qu'une dose quotidienne de 20mg.jour^{-1} a des effets similaires avec une régulation favorable de la balance énergétique chez les animaux supplémentés (Dal-Pan et al., 2010). Pour la première fois ces travaux *in vivo* mettent en évidence la capacité du resvératrol chez un primate, à moduler la balance énergétique de manière favorable.

En conclusion, nos travaux en cours permettront sûrement de compléter à terme, ce schéma complexe qu'est le vieillissement et d'apporter des bases nouvelles sur l'utilisation de la restriction calorique et du resvératrol. Récemment une question m'a été posée : « Pensez vous qu'il sera possible d'augmenter la longévité chez l'Homme dans un futur proche et si oui, de combien de temps ? ». Cette question rappelle alors que lorsque l'on travaille sur une telle thématique il ne faut sans doute pas perdre de vue les retombées que peuvent avoir les résultats sur chaque dimension de nos sociétés et sur l'Homme. Une étude a rapporté à ce propos il y a environ 10 ans, lors de l'évaluation des projections sur les tendances futures de l'espérance de vie par des chercheurs (biologistes, démographes, épidémiologistes), qu'il existe un « désaccord » sur la question « de combien d'années pourrait être l'augmentation future de l'espérance de vie humaine ? ». L'enquête auprès de plus de 60 chercheurs a révélé que pour une personne née en 2100, les opinions diffèrent largement, avec 50% des prévisions ne dépassant pas 100 ans et une minorité de prévisions « très » optimistes allant de 500 à 5000 ans !!! (Richel, 2003). Pour ma part je n'ai pas

répondu, gardant en tête la conférence animée de Miroslav Radman sur les organismes immortels, parce qu'après tout chacun a sa réponse, la question fondamentale restant « sommes-nous prêts ? ».

Références bibliographiques

- A -

- Abele D, Brey T, Philipp E. Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. Exp Gerontol. 2009; 44(5):307-15.

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science. 2000; 287(5461):2185-95.

- Agarwal B, Baur JA. Resveratrol and life extension. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1215:138-43.

- Aggarwal BB. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. Annu Rev Nutr. 2010; 30:173-99.

- Albani D, Polito L, Signorini A, Forloni G. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. Biofactors. 2010; 36(5):370-6.

- Alexander P. The role of DNA lesions in the processes leading to aging in mice. Symp Soc Exp Biol. 1967; 21:29-50.

- Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Verdaguer E, Canudas AM, Pallàs M, Camins A. Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. Neuroscience. 2007; 147(3):746-56.

- Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(10):6216-20.

- Anton B, Vitetta L, Cortizo F, Sali A. Can we delay aging? The biology and science of aging. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1057:525-35.

- Argentino DP, Dominici FP, Al-Regaiey K, Bonkowski MS, Bartke A, Turyn D. Effects of long-term caloric restriction on early steps of the insulin-signaling system in mouse skeletal muscle. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2005; 60(1):28-34.

- Artal-Sanz M, de Jong L, Tavernarakis N. Caenorhabditis elegans: a versatile platform for drug discovery. Biotechnol J. 2006; 1(12):1405-18.

- Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB, Aiken JM. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. FASEB J. 1997; 11(7):573-81.

- Aujard F, Cayetanot F, Bentivoglio M, Perret M. Age-related effects on the biological clock and its behavioral output in a primate. Chronobiol Int. 2006; 23(1-2):451-60.

- Aujard F, Perret M, and Vannier G. Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? J Comp Physiol B. 1998; 168: 540-548,.

- Aujard F, Bluet-Pajot MT, Zizzari P, Perret M, Epelbaum J. IGF-1: a marker of individual life-span in a primate. Ageing Res. 2010; 2, e1.

- Aujard F, Cayetanot F, Terrien J, Van Someren EJW. Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate. Exp. Gerontol. 2007; 42, 1079–1087.

- Aujard F, Dkhissi-Benyahya O, Fournier I, Claustrat B, Schilling A, Cooper HM, Perret M. Artificially accelerated aging by shortened photoperiodalters early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatoninexcretion in a small primate,

Microcebus murinus. Neuroscience. 2001; 105, 403–412.

- Aujard F, Némoz-Bertholet F. Response to urinary volatiles and chemosensory function decline with age in a prosimian primate. Physiol. Behav. 2004; 81, 639–644.

- Austad SN, Fischer KE. Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from the bats and marsupials. J Gerontol. 1991; 46(2):B47-53.

- B -

- Bailey CJ, Day C. Avandamet: combined metformin-rosiglitazone treatment for insulin resistance in type 2 diabetes. Int J Clin Pract. 2004; 58(9):867-76.

- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. Mol Endocrinol. 1996; 10(7):903-18.

- Barense MD, Fox MT, Baxter MG. Aged rats are impaired on an attentional set-shifting task sensitive to medial frontal cortex damage in young rats. Learn. Mem. 2002; 9, 191–201.

- Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. Ann N Y Acad Sci. 1998; 854:224-38.

- Barrou Z, Lemaire A, Boddaert J, Verny M. Diabetes mellitus and cognition: is there a link? Psychol Neuropsychiatr Vieil. 2008; 6(3):189-98.

- Bartke A. Growth hormone, insulin and aging: the benefits of endocrine defects. Exp Gerontol. 2011; 46(2-3):108-11.

- Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. J Clin Invest. 1998; 101(7):1353-61.

- Barzilai N, Gabriely I, Atzmon G, Suh Y, Rothenberg D, Bergman A. Genetic studies reveal the role of the endocrine and metabolic systems in aging. J Clin Endocrinol Metab. 2010; 95(10):4493-500.

- Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L. Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans. Mech Ageing Dev. 2007; 128(10):546–552.

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006; 444:337–342.

- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature Reviews Drug Discovery 2006 ; 5: 493-506.

- Baur JA. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. Mech Ageing Dev. 2010; 131(4):261-9.

- Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. Drugs Exp Clin Res. 2003; 29(5-6):181-7.

- Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. Ann N Y Acad Sci. 1998; 854:118-27.

- Beevers CS, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. Int J Cancer 2006 ; 119: 757-764.

- Belcour L, Vierny C. Variable DNA splicing sites of a mitochondrial intron: relationship to the senescence process in Podospora. EMBO J. 1986; 5(3):609-14.

- Beltran WA, Vanore M, Ollivet F, Nemoz-Bertholet F, Aujard F, Clerc B, Chahory S. Ocular findings in two colonies of gray mouse lemurs (Microcebus murinus). Vet. Ophthalmol. 2007; 10, 43–49.

- Berryman DE, Christiansen JS, Johannsson G, Thorner MO, Kopchick JJ. Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models. Growth Horm IGF Res. 2008; 18(6):455-71.

- Bertrand HA, Lynd FT, Masoro EJ, Yu BP. Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. J Gerontol. 1980; 35(6):827-35.

- Black A, Allison DB, Shapses SA, Tilmont EM, Handy AM, Ingram DK, Roth GS, Lane MA. Calorie restriction and skeletal mass in rhesus monkeys (Macaca mulatta): evidence for an effect mediated through changes in body size. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2001; 56(3):B98-107.

- Blain H, Jeandel C. Normal aging. Biological, functional, and relational characteristics. Epidemiologic and sociological data. Prevention of pathologic aging. Rev Prat. 2003; 53(1):97-106

- Bons N, Mestre N, Petter A. Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, Microcebus murinus. Neurobiol Aging. 1992; 13(1):99-105.

- Bons, N., Jallageas, V., Silhol, S., Mestre-Francés, N., Petter, A., Delacourte, A.,. Immunocytochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate Microcebus murinus. C. R. Acad. Sci. 1995; 318, 77–83.

- Bowman TA, Ramakrishnan SK, Kaw M, Lee SJ, Patel PR, Golla VK, Bourey RE, Haram PM, Koch LG, Britton SL, Wisløff U, Lee AD, Najjar SM. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance and steatosis in rats with low aerobic capacity. Endocrinology. 2010;151(11):5157-64.

- Boyce JM, Shone GR. Effects of ageing on smell and taste. Postgrad Med J. 2006; 82(966):239-41.

- Branch-Mays GL, Dawson DR, Gunsolley JC, Reynolds MA, Ebersole JL, Novak KF, Mattison JA, Ingram DK, Novak MJ. The effects of a calorie-reduced diet on periodontal inflammation and disease in a non-human primate model. J Periodontol. 2008; 79(7):1184-91.

- Brand MD, Couture P, Else PL, Withers KW, Hulbert AJ. Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. Biochem J. 1991; 275 (Pt 1):81-6.

- Brecchia G, Bonanno A, Galeati G, Federici C, Maranesi M, Gobbetti A, Zerani M, Boiti C. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. Domest Anim Endocrinol. 2006; 31(2):105-22.

- Breese CR, Ingram RL, Sonntag WE. Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. J Gerontol. 1991; 46(5):B180-7.

- Browning JD, Baxter J, Satapati S, Burgess SC. The effect of short-term fasting on liver and skeletal muscle lipid, glucose, and energy metabolism in healthy women and men. J Lipid Res. 2012; 53(3):577-86.

- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. Science. 2004; 303(5666):2011-5.

- Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. J Comp Physiol B. 2008; 178(4):439-45.

- Buford TW, Willoughby DS. Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: a brief review. Appl Physiol Nutr Metab. 2008; 33(3):429-33.

- Burgess TA, Robich MP, Chu LM, Bianchi C, Sellke FW. Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle. Arch Surg. 2011; 146(5):556-64.

- Burkhalter TM, Hillman CH. A narrative review of physical activity, nutrition, and obesity to cognition and scholastic performance across the human lifespan. Adv Nutr. 2011; 2(2):201S-6S.

- Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez R, Orfila A, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, et al. Absence of effects of Sir2 over-expression on

lifespan in C. elegans and drosophila. Nature. 2011; 477:482–485.

- Butler RN, Warner HR, Williams TF, Austad SN, Brody JA, Campisi J, Cerami A, Cohen G, Cristofalo VJ, Drachman DA, Finch CE, Fridovich I, Harley CB, Havlik RJ, Martin GM, Miller RA, Olshansky SJ, Pereira-Smith OM, Smith JR, Sprott RL, West MD, Wilmoth JR, Wright WE. The aging factor in health and disease: the promise of basic research on aging. Aging Clin Exp Res. 2004; 16(2):104-11

- Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond). 2009; 116(7):539-64.

- C -

- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. Ageing Res Rev. 2009; 8(4):268-76.

- Canale CI, Huchard E, Perret M, Henry PY. Reproductive resilience to food shortage in a small heterothermic primate. PLoS One. 2012; 7(7):e41477.

- Canale CI, Perret M, Théry M, Henry PY. Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate. J Exp Biol. 2011; 214(Pt 4):551-60.

- Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, Fiebich BL. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. J Neuroinflammation. 2007; 4:25.

- Cantó C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. Trends Endocrinol Metab. 2009; 20(7):325-31.

- Carter CS, Leeuwenburgh C, Daniels M, Foster TC. Influence of calorie restriction on measures of age-related cognitive decline: role of increased physical activity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009; 64(8):850-9.

- Catalano KJ, Bergman RN, Ader M. Increased susceptibility to insulin resistance associated with abdominal obesity in aging rats. Obes Res. 2005; 13(1):11-20.

- Cayetanot F, Bentivoglio M, Aujard F. Arginine-vasopressin and vasointestinal polypeptide rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the mouse lemur reveal aging-related alterations of circadian pacemaker neurons in a non-human primate. Eur. J. Neurosci. 2005a; 22, 902–910.

- Cayetanot F, Deprez J, Aujard F. Calbindin D-28 K protein cells in a primate suprachiasmatic nucleus: localization, daily rhythm and age-related changes. Eur. J. Neurosci. 2007; 26, 2025–2032.

- Cayetanot F, Nygard M, Perret M, Kristensson K, Aujard F. Plasma levels of interferon-correlate with age-related disturbances of circadian rhythms and survival in a non-human primate. Chronobiol. Int. 2009; 26, 1587–1601.

- Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH. Resveratrol--pills to replace a healthy diet? Br J Clin Pharmacol. 2011; 72(1):27-38.

- Chang Y, Ryu S, Zhang Y, Son HJ, Kim JY, Cho J, Guallar E. A cohort study of serum bilirubin levels and incident non-alcoholic fatty liver disease in middle aged Korean workers. PLoS One. 2012; 7(5):e37241.

- Cheriyath P, Gorrepati VS, Peters I, Nookala V, Murphy ME, Srouji N, Fischman D. High Total Bilirubin as a Protective Factor for Diabetes Mellitus: An Analysis of NHANES Data From 1999 - 2006. J Clin Med Res. 2010; 2(5):201-6.

- Chetelat G, Desgranges B, De La Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC. Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. Neuroreport. 2002; 13, 1939–1943.

- Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. Br J Nutr. 2012; 14:1-10.

- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. Brain Res Bull. 2012; 87(2-3):144-53.

- Clancy DJ, Gems D, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L. Dietary restriction in long-lived dwarf flies. Science. 2002; 296(5566):319.

- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. Science. 2004; 305(5682):390-2.

- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science 2009 ; 325: 201-204.

- Colman RJ, Anderson RM. Nonhuman primate calorie restriction. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(2):229-39.

- Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Weindruch R. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2008 ; 63: 556-559.

- Colvez A et Robine JM. Quelle espérance pour quelle vie ? Revue futurible, N°387. 2012

- Cook R, Calabrese EJ. The importance of hormesis to public health. Environ Health Perspect. 2006; 114(11):1631-5.

- Cook-Wiens E, Grotewiel MS. Dissociation between functional senescence and oxidative stress resistance in Drosophila. Exp Gerontol. 2002; 37(12):1347-57.

- Corbin GD, and Schmid J. Insect secretions determine habitat use patterns by a female lesser mouse lemur (Microcebus murinus). Am J Primatol. 1995; 37: 317-324,.

- Crews DE. Artificial environments and an aging population: designing for age-related functional losses. J Physiol Anthropol Appl Human Sci. 2005; 24(1):103-9.

- Crews DE. Senescence, aging and disease. Journal of Physiological Anthropology Vol. 26; 2007 No. 3 P 365-372

- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. Toxicol Sci. 2004; 82:614–619.

- Csiszar A, Labinskyy N, Jimenez R, Pinto JT, Ballabh P, Losonczy G, Pearson KJ, de Cabo R, Ungvari Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. Mech Ageing Dev. 2009; 130(8):518-27.

- Csiszar A, Labinskyy N, Podlutsky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, Mukhopadhyay P, Pacher P, Hu F, de Cabo R, Ballabh P, Ungvari Z. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294(6):H2721-35.

- Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1215:117-22.

- Curtis C, Landis GN, Folk D, Wehr NB, Hoe N, Waskar M, Abdueva D, Skvortsov D, Ford D, Luu A, Badrinath A, Levine RL, Bradley TJ, Tavaré S, Tower J. Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in Drosophila reveals a species-general network of aging and metabolic genes. Genome Biol. 2007; 8(12):R262.

- D -

- Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. BMC Physiol. 2010; 10:11.

- Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, Picq JL, Aujard F; RESTRIKAL Consortium. Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. PLoS One. 2011; 6(1):e16581.

- Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, Marchal J, Zahariev A, Chery I, Zizzari P, Perret M, Picq JL, Epelbaum J, Blanc S, Aujard F. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL

study in Microcebus murinus. Age (Dordr). 2011; 33(1):15-31.

- Daminet S, Jeusette I, Duchateau L, Diez M, Van de Maele I, De Rick A. Evaluation of thyroid function in obese dogs and in dogs undergoing a weight loss protocol. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003; 50(4):213-8.

- Dammhahn M, Kappeler PM. Small-scale coexistence of two mouse lemur species (Microcebus berthae and M. murinus) within a homogeneous competitive environment. Oecologia. 2008; 157(3):473-83.

- Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. Drugs Exp Clin Res. 1999; 25(2-3):115-20.

- Das F, Ghosh-Choudhury N, Dey N, Mandal CC, Mahimainathan L, et al. Unrestrained Mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2 increase expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 to regulate phosphorylation of akt kinase. J Biol Chem 2012 ; 287: 3808-3822.

- de Beauvoir S. La vieillesse. Gallimard, Paris, 1970.

- de Groot LC, Verheijden MW, de Henauw S, Schroll M, van Staveren WA; SENECA Investigators. Lifestyle, nutritional status, health, and mortality in elderly people across Europe: a review of the longitudinal results of the SENECA study. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004; 59(12):1277-84.

- de Haan G, Gelman R, Watson A, Yunis E, Van Zant G. A putative gene causes variability in lifespan among genotypically identical mice. Nat Genet. 1998; 19(2):114-6.

- Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. Ann Neurol. 1978; 4(4):345-56.

- Delacourte A, Sautière PE, Wattez A, Mourton-Gilles C, Petter A, Bons N. Biochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate Microcebus murinus. C. R. Acad. Sci. 1995 ; 318, 85–89.

- Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. Curr Opin Pediatr. 2011; 23(2):194-200.

- Dewar RE, Richard AF. Evolution in the hypervariable environment of Madagascar. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(34):13723-7.

- Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Tillman JB, Walford RL, Spindler SR Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes. Am J Physiol. 1999; 277(2 Pt 1):E352-60.

- Dhenain M, Chenu E, Hisley CK, Aujard F, Volk A. Regional atrophy in the brain of lissencephalic mouse lemur primates: measurement by automatic histogram-based segmentation of MR images. Magn Reson Med. 2003; 50(5):984-92.

- Dhenain M, Duyckaerts C, Michot JL, Volk A, Picq JL, Boller F. Cerebral T2-weighted signal decrease during aging in the mouse lemur primate reflects iron accumulation. Neurobiol Aging. 1998; 19(1):65-9.

- Dhenain M, Michot JL, Privat N, Picq JL, Boller F, Duyckaerts C, Volk A. MRI description of cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiol Aging. 2000; 21(1):81-8.

- Dhenain M, Michot JL, Volk A, Picq JL, Boller F. T2-weighted MRI studies of mouse lemurs: a primate model of brain aging. Neurobiol Aging. 1997; 18(5):517-21.

- Dhenain M, Michot JL, Volk A, Gauthier CA, Boller F, Picq JL. Etude préliminaire du vieillissement cognitif des microcèbes murins dans une version spatiale du test de non appariement retardé (Preliminary study of cerebral aging in mouse lemurs by a spatial version of the delayed non matching to sample task). Primatologie. 1998a; 1, 309–331.

- Diao LH, Bickford PC, Stevens JO, Cline EJ, Gerhardt GA. Caloric restriction enhances evoked DA overflow in striatum and nucleus accumbens of aged Fischer 344 rats. Brain Res. 1997; 763(2):276-80.

- Dias GP, Cavegn N, Nix A, do Nascimento Bevilaqua MC, Stangl D, Zainuddin MS, Nardi AE, Gardino PF, Thuret S. The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. Oxid Med Cell Longev. 2012; 541971.

- Dolinsky VW, Dyck JR. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. Biochim Biophys Acta. 2011; 1812(11):1477-89.

- Dournaud P, Gautron JP, Pattou E, Bons N, Mestre N, Petter A, Kordon C, Epelbaum J. Choline acetyltransferase and somatostatin levels in aged Microcebus murinus brain. Neurobiol. Aging. 1994; 15, 727–731.

- Dowling RJ, Goodwin PJ, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. BMC Med. 2011; 9:33.

- Duffy PH, Feuers RJ, Leakey JA, Nakamura K, Turturro A, et al. Effect of chronic caloric restriction on physiological variables related to energy metabolism in the male Fischer 344 rat. Mech Ageing Dev 1989 ; 48: 117-133.

- Duron E, Hanon O. Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. Vasc Health Risk Manag. 2008; 4(2):363-81.

- E -

- Ebersole JL, Steffen MJ, Reynolds MA, Branch-Mays GL, Dawson DR, Novak KF, Gunsolley JC, Mattison JA, Ingram DK, Novak MJ. Differential gender effects of a reduced-calorie diet on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. J Periodontal Res. 2008; 43(5):500-7.

- Edrey YH, Park TJ, Kang H, Biney A, Buffenstein R. Endocrine function and neurobiology of the longest-living rodent, the naked mole-rat. Exp Gerontol. 2011; 46(2-3):116-23.

- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstein B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. Nat Cell Biol. 2009; 11(11):1305-14.

- Elliott PJ, Walpole S, Morelli L, Lambert PD, Lunsmann W et al. Resveratrol/SRT501, Sirtuin SIRT1 activator, Treatment of type II diabetes. Drugs Fut. 2009; 34: 291-295.

- Epelbaum J, Bassant MH, Bluet-Pajot MT, Gourdji D, Jazat-Poindessous F, Kappeler L, Zizzari P. [Neuroendocrine aging]. Ann Biol Clin (Paris). 2001; 59(4):437-44.

- F -

- Farooqui T, Farooqui AA. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Mech Ageing Dev. 2009; 130(4):203-15.

- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci. 1997; 61(21):2103-10.

- Fernández AF, Fraga MF. The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan. Epigenetics. 2011; 6(7):870-4. Epub 2011 Jul 1.

- Fietz J. Mating system of Microcebus murinus. Am J Primatol. 1999; 48: 127-133.

- Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(12):6736-41.

- Fontana L, Klein S, Holloszy JO, Premachandra BN. Effect of long-term calorie restriction with adequate protein and micronutrients on thyroid hormones. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(8):3232-5.

- Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3

concentration in humans. Aging Cell 2008 ; 7: 681-687.

- Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. Aging Cell. 2008; 7(5):681-7.

- Fontán-Lozano A, López-Lluch G, Delgado-García JM, Navas P, Carrión AM. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. Mol Neurobiol. 2008; 38(2):167-77.

- Forsum E, Hillman PE, Nesheim MC. Effect of energy restriction on total heat production, basal metabolic rate, and specific dynamic action of food in rats. J Nutr. 1981; 111(10):1691-7.

- Fotenos AF, Snyder AZ, Girton LE, Morris JC, Buckner RL. Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD. Neurology. 2005; 64(6):1032-9.

- Francis PJ, Appukuttan B, Simmons E, Landauer N, Stoddard J, Hamon S, Ott J, Ferguson B, Klein M, Stout JT, Neuringer M. Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease. Hum Mol Genet. 2008; 17(17):2673-80.

- Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 273(2):793-8.

- Furness LJ, Speakman JR. Energetics and longevity in birds. Age (Dordr). 2008; 30(2-3):75-87.

- G -

- Ganzhorn JU, Wright PC. Temporal patterns in primate leaf eating: the possible role of leaf chemistry. Folia Primatol (Basel). 1994; 63(4):203-8.

- Ganzhorn JU, Kappeler PM.. Lemurs of the Kirindy forest. Primate report. 1996; 46, 257–274.

- Gasperi M, Castellano AE. Growth hormone/insulin-like growth factor I axis in neurodegenerative diseases. J Endocrinol Invest. 2010; 33(8):587-91.

- Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Mason MM, Castle AL, Refetoff S, Vinson C, Reitman ML. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(25):14623-8.

- Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano DR, Cattaneo A, Cellerino A. Annual fishes of the genus Nothobranchius as a model system for aging research. Aging Cell. 2005; 4(5):223-33.

- Genin F, and Perret M. Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (Microcebus murinus): effects of photoperiod and food restriction. Comp Biochem Physiol B. 2003; 136: 71-81,.

- Genin F, and Perret M. Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. Physiol Behav. 2000 ; 71: 315-321.

- Génin F, Masters JC. Le mythe du microcèbe primitif. Revue de primatologie 2011, document 5, DOI : 10.4000/primatologie.699

- Ghanim H, Sia C, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, Chaudhuri A, Dandona P. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of polygonum cuspidatum containing resveratrol. J Clin Endocrinol Metab. 2010; 95:E1–E8.

- Gill TM. Assessment of function and disability in longitudinal studies. J Am Geriatr Soc. 2010; 58 Suppl 2:S308-12.

- Gimbert V et Godot C. Vivre ensemble plus longtemps: enjeux et opportunités pour l'action publique du vieillissement de la population française. Rapports et Documents, 263 p. Girardot-Buffard P. 2010

- Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, Perret M. Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (Microcebus murinus). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2008; 294, 1958–1967.

- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. Clin Biochem. 2003; 36:79–87.

- Gollücke AP, Ribeiro DA. Use of grape polyphenols for promoting human health: a review of patents. Recent Pat Food Nutr Agric. 2012; 4(1):26-30.

- Gontier G, Holzenberger M. [IGF and insulin signaling pathways in longevity]. Biol Aujourdhui. 2010; 204(3):243-50.

- Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. Neuroimage. 2001; 14, 21–36.

- Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radák Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. Appl Physiol Nutr Metab. 2007; 32(5):948-53.

- Gottschalk A, Almedom RB, Schedletzky T, Anderson SD, Yates JR 3rd, Schafer WR. Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in Caenorhabditis elegans. EMBO J. 2005; 24(14):2566-78.

- Gredilla R, Grief J, Osiewacz HD. Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model Podospora anserina. Exp Gerontol. 2006; 41(4):439-47.

- Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. Amino Acids. 2008; 35(1):29-36.

- Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P, Cook-Wiens E. Functional senescence in Drosophila melanogaster. Ageing Res Rev. 2005; 4(3):372-97.

- Gu Y, Scarmeas N. Dietary patterns in Alzheimer's disease and cognitive aging. Curr Alzheimer Res. 2011; 8(5):510-9.

- Guarente L, Picard F. Calorie restriction--the SIR2 connection. Cell. 2005; 120(4):473-82.

- Guralnick JM, Kaplan GA. Predictors of healthy aging: prospective evidence from the Alameda county study. American Journal of Public Health. 1989; 79:703-708.

- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci. 2000; 899:136-47.

- H -

- Halliwell B, Cutteridge J. Free radicals in biology and disease. Oxford: Oxford Science Pub.1999.

- Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovasc Res. 2007; 73:341–347.

- Hambly C, Speakman JR. Contribution of different mechanisms to compensation for energy restriction in the mouse. Obes Res. 2005; 13(9):1548-57.

- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11: 298–300

- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956; 11(3):298-300.

- Harrison DE, Archer JR. Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. J Nutr. 1987; 117(2):376-82.

- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. Nature. 2009; 460(7253):392-5.

- Hartmann N, Reichwald K, Lechel A, Graf M, Kirschner J, Dorn A, Terzibasi E, Wellner J, Platzer M, Rudolph KL, Cellerino A, Englert C. Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Mech Ageing Dev. 2009; 130(5):290-6.

- Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance:

lessons from the mouse? Science. 2003; 299(5611):1355-9.

- Havighurst R. The sociologic meaning of aging. Geriatrics. 1958; 13(1):43-50.

- Hawasli AH, Saifee O, Liu C, Nonet ML, Crowder CM. Resistance to volatile anesthetics by mutations enhancing excitatory neurotransmitter release in Caenorhabditis elegans. Genetics. 2004; 168(2):831-43.

- Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry (Mosc). 1997; 62(11):1180-90.

- Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. Science. 2006; 311(5765):1257.

- Hertoghe T. The "multiple hormone deficiency" theory of aging: is human senescence caused mainly by multiple hormone deficiencies? Ann N Y Acad Sci. 2005; 1057:448-65.

- Hladik CM. The dry forest of West coast of Madagascar: climate, phenology and food available for prosimians. In: Nocturnal Malagasy Primates: Ecology, Physiology and Behaviour. Edited by P Charles-Dominique, HM Cooper, G Pariente, CM Hladik, A Petter- Rousseaux, JJ Petter, Academic Press, New York 1-40, 1980.

- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloen A, Evens P, Cervera P, LeBouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003; 421:182–187

- Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, Honma A, Irino M, Toda K, Matsumura A, et al. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). Mech Ageing Dev. 1984; 26(1):91-102.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003; 425(6954):191-6.

- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. Physiol Rev. 2007; 87(4):1175-213.

- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. Diabetes. 2000; 49(12):2063-9.

- Hunt ND, Li GD, Zhu M, Levette A, Chachich ME, et al. Effect of calorie restriction and refeeding on skin wound healing in the rat. Age 2011.

- I -

- Illouz F, Roulier V, Rod A, Gallois Y, Pellé CP, Aubé C, Rohmer V, Ritz P, Ducluzeau PH. Distribution of adipose tissue: quantification and relationship with hepatic steatosis and vascular profiles of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. Diabetes Metab. 2008; 34(1):68-74.

- Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, Renquist DM, Knapka JJ, et al. Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. J Gerontol. 1990; 45: B148-163.

- Ingram DK, Weindruch R, Spangler EL, Freeman JR, Walford RL. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. J Gerontol. 1987; 42(1):78-81.

- J -

- Jackson JR, Ryan MJ, Alway SE. Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66(7):751-64.

- Jackson P, Romo MM, Castillo MA, Castillo-Durán C. [Junk food consumption and child nutrition. Nutritional anthropological analysis]. Rev Med Chil. 2004 Oct; 132(10):1235-42.

- Jacobson MW, McEvoy LK, Dale A, Fennema-Notestine C. Cognitive phenotypes, brain morphometry and the detection of cognitive

decline in preclinical AD. Behav Neurol. 2009; 21(1):29-37.

- Jallageas V, Privat N, Mestre-Francés N, Silhol S, Bons N. Age-related changes in serotonergic and catecholaminergic brain systems in the lemurian primate Microcebus murinus. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998; 839, 628–630.

- Jang S, Johnson RW. Can consuming flavonoids restore old microglia to their youthful state? Nutr Rev. 2010; 68(12):719-28.

- Jeandel C. Vieillissement et Santé. Les différents parcours du vieillissement. Sève. 2005:25-35.

- Jochems C, Islander U, Erlandsson M, Verdrengh M, Ohlsson C, Carlsten H. Osteoporosis in experimental postmenopausal polyarthritis: the relative contributions of estrogen deficiency and inflammation. Arthritis Res Ther. 2005; 7(4):R837-43.

- Joly M, Deputte B, Verdier JM. Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, Microcebus murinus. Neurobiol. Aging. 2006; 27, 1045–1049.

- Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. J Neurosci. 2009; 29(41):12795-801.

- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. Am J Clin Nutr. 2005; 81(1 Suppl):313S-316S.

- Joseph JE. Functional neuroimaging studies of category specificity in object recognition: a critical review and meta-analysis. Cogn Affect Behav Neurosci. 2001; 1(2):119-36.

- Joseph-Mathurin Nelly, Olene Dorieux, Audrey Kraska, Anne Bertrand, Mathieu Santin, Nadine El Tannir El Tayara et Marc Dhenain. Magnetic resonance imaging in primates. The example of the mouse lemur (Microcebus murinus): From detection of pathological aging to therapeutic evaluations. Revue de primatologie, 2010.

- Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. J Nutr. 2005; 135(4):757-60.

- Judge DS, Carey JR. Postreproductive life predicted by primate patterns. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2000; 55(4):B201-9.

- Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. Growth Horm IGF Res. 2003; 13(4):113-70.

- K -

- Kaeberlein M. Lessons on longevity from budding yeast. Nature. 2010; 464(7288):513-9.

- Kalmar JM, Button DC, Gardiner K, Cahill F, Gardiner PF. Caloric restriction does not offset age-associated changes in the biophysical properties of motoneurons. J Neurophysiol. 2009; 101(2):548-57.

- Kalpouzos G, Chételat G, Baron JC, Landeau B, Mevel K, Godeau C, Barré L, Constans JM, Viader F, Eustache F, Desgranges B. Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. Neurobiol. Aging. 2009; 30, 112–124.

- Kanfi Y, Shalman R, Peshti V, Pilosof SN, Gozlan YM, Pearson KJ, Lerrer B, Moazed D, Marine JC, de Cabo R, Cohen HY. Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. FEBS Lett. 2008; 582(5):543-8.

- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Périn L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J, Le Bouc Y, Holzenberger M. Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. PLoS Biol. 2008; 6(10):e254.

- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2009; 54(2):111-8.

- Keller ET, Murtha JM. The use of mature zebrafish (Danio rerio) as a model for human

aging and disease. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2004; 138(3):335-41.

- Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, et al. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. Am J Physiol. 1994 ; 266: E540-547.

- Kemnitz JW. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. ILAR J. 2011; 52(1):66-77.

- Kemnitz JW, Roecker EB, Haffa AL, Pinheiro J, Kurzman I, Ramsey JJ, MacEwen EG. Serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations accross the lifespan of laboratory-housed monkeys. J. Med. Primatol. 2000; 29, 330–337.

- Kenyon C. A pathway that links reproductive status to lifespan in Caenorhabditis elegans. Ann N Y Acad Sci. 2010; 1204:156-62.

- Kenyon C. Environmental Factors and Gene Activities That Influence Life Span. C. elegans II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Chapter 28.

- Kim YA, Lim SY, Rhee SH, Park KY, Kim CH, Choi BT, Lee SJ, Park YM, Choi YH. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. Int J Mol Med. 2006; 17(6):1069-75.

- Kirkwood TL, Kapahi P, Shanley DP. Evolution, stress, and longevity. J Anat. 2000; 197 Pt 4:587-90.

- Kishi S. The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: a novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system. Birth Defects Res C Embryo Today. 2011; 93(3):229-48.

- Klass MR. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode Caenorhabditis elegans and initial results. Mech Ageing Dev. 1983; 22(3-4):279-86.

- Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. JAMA. 2004; 292(12):1433-9.

- Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, Sugawara A, Totsuka K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. JAMA. 2009; 301(19):2024-35.

- Koide N, Oyama T, Miyashita Y, Shirai K. Effects of calorie-restricted low-carbohydrate diet on glucose and lipid metabolism in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats. J Atheroscler Thromb. 2007; 14(5):253-60.

- Koizumi A, Wada Y, Tuskada M, Kayo T, Naruse M, Horiuchi K, Mogi T, Yoshioka M, Sasaki M, Miyamaura Y, Abe T, Ohtomo K, Walford RL. A tumor preventive effect of dietary restriction is antagonized by a high housing temperature through deprivation of torpor. Mech Ageing Dev. 1996; 92(1):67-82.

- Kraska A, Dorieux O, Picq JL, Petit F, Bourrin E, Chenu E, Volk A, Perret M, Hantraye P, Mestre-Frances N, Aujard F, Dhenain M. Age-associated cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiol Aging. 2011; 32(5):894-906.

- Kroon PA, Iyer A, Chunduri P, Chan V, Brown L. The cardiovascular nutrapharmacology of resveratrol: pharmacokinetics, molecular mechanisms and therapeutic potential. Curr Med Chem. 2010; 17(23):2442-55.

- Kunikate JM, Pekary AE, Hershman JM. Aging and the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. In: Endocrinology and Metabolism in the Elderly. Blackwell, Boston, MA, 1992; pp. 92–110.

- L -

- La Porte C, Voduc N, Zhang G, Seguin I, Tardiff D, Singhal N, Cameron D. Steady-state pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. Clin Pharmacokinet. 2010; 49:449–54.

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 2006; 127:1109–1122.

- Lahann P. Feeding ecology and seed dispersal of sympatric cheirogaleid lemurs (Microcebus murinus, Cheirogaleus medius, Cheirogaleus major) in the littoral rainforest of south-east Madagascar Journal of Zoology. Print ISSN 0952-8369

- Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont EM, Cutler RG, Roth GS. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(9):4159-64.

- Lane MA, Ball SS, Ingram DK, Cutler RG, Engel J, et al. Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points. Am J Physiol. 1995; 268: E941-948.

- Lane MA, Mattison J, Ingram DK, Roth GS. Caloric restriction and aging in primates: Relevance to humans and possible CR mimetics. Microsc Res Tech. 2002; 59(4):335-8.

- Lang DH, Gerhard GS, Griffith JW, Vogler GP, Vandenbergh DJ, Blizard DA, Stout JT, Lakoski JM, McClearn GE. Quantitative trait loci (QTL) analysis of longevity in C57BL/6J by DBA/2J (BXD) recombinant inbred mice. Aging Clin Exp Res. 2010; 22(1):8-19.

- Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, Devau G, Dhenain M, Dorieux O, Epelbaum J, Gomez D, Hardy I, Henry PY, Irving EA, Marchal J, Mestre-Francés N, Perret M, Picq JL, Pifferi F, Rahman A, Schenker E, Terrien J, Théry M, Verdier JM, Aujard F. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. Ageing Res Rev. 2012; 11(1):150-62.

- Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK, Volaufova J, Smith SR, Alfonso AJ, Lefevre M, Rood JC, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Effect of 6-month calorie restriction and exercise on serum and liver lipids and markers of liver function. Obesity (Silver Spring). 2008; 16(6):1355-62.

- Le Couteur DG, Warren A, Cogger VC, Smedsrød B, Sørensen KK, De Cabo R, Fraser R, McCuskey RS. Old age and the hepatic sinusoid. Anat Rec (Hoboken). 2008; 291(6):672-83.

- Lee JH, Song MY, Song EK, Kim EK, Moon WS, Han MK, Park JW, Kwon KB, Park BH. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. Diabetes. 2009; 58(2):344-51.

- Lesko LJ, Atkinson AJ Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41:347-66.

- Liang H, Masoro EJ, Nelson JF, Strong R, McMahan CA, Richardson A. Genetic mouse models of extended lifespan. Exp Gerontol. 2003; 38(11-12):1353-64.

- Liao CY, Rikke BA, Johnson TE, Diaz V, Nelson JF. Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. Aging Cell. 2010;9(1):92-5.

- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nat Rev Genet. 2007; 8(5):353-67.

- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. Genes Dev. 2004; 18(1):12-6.

- Liontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. Anticancer Res. 2004; 24:987–998.

- Lu KT, Chiou RY, Chen LG, Chen MH, Tseng WT, et al. Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral

blood flow elevation. J Agric Food Chem. 2006; 54:3126–3131.

- Luo Y. Long-lived worms and aging. Redox Rep. 2004; 9(2):65-9.

- M -

- Magri F, Cravello L, Fioravanti M, Vignati G, Albertelli N, Bonacina M, Ferrari E. Thyroid function in old and very old healthy subjects. J. Endocrinol. Invest. 2002 ; 25, 60–63.

- Marchal J, Blanc S, Epelbaum J, Aujard F, Pifferi F. Effects of chronic calorie restriction or dietary resveratrol supplementation on insulin sensitivity markers in a primate, Microcebus murinus. PLoS One. 2012; 7(3):e34289.

- Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 302:369–373.

- Markowska AL. Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. Neurobiol Aging. 1999; 20(2):177-89.

- Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. The molecular basis of longevity, and clinical implications. Maturitas. 2010; 65(2):87-91.

- Martin B, Golden E, Egan JM, Mattson MP, Maudsley S. Reduced energy intake: the secret to a long and healthy life? IBS J Sci. 2007; 2(2):35-39.

- Martin RD. A preliminary field-study of the lesser mouse lemur (Microcebus murinus J.F. Miller 1777). Zeitschrift Für Tierpsychologie Suppl. 9: 42-70, 1972.

- Martin RD. A review of the behavior and ecology of the lesser mouse lemur (Microcebus murinus). In: Comparative ecology and behavior of primates. Edited by RP Michael, JH Crooks, Academic, London 1-68, 1973.

- Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev. 2005; 126(9):913-22.

- Mattson MP, Kapogiannis D, Greig NH. Tweaking energy metabolism to prevent and treat neurological disorders. Clin Pharmacol Ther. 2010; 88(4):437-9.

- Mattson MP, Son TG, Camandola S. Viewpoint: mechanisms of action and therapeutic potential of neurohormetic phytochemicals. Dose Response. 2007; 5(3):174-86.

- Mattson MP. Dietary factors, hormesis and health. Ageing Res Rev. 2008;7(1):43-8.

- Mazzoccoli G, Pazienza V, Piepoli A, Muscarella LA, Inglese M, De Cata A, Giuliani F, Tarquini R. Hypothalamus-hypophysis-thyroid axis function in healthy aging. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2010; 24, 433–439.

- McCarter R, Masoro EJ, Yu BP. Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? Am J Physiol. 1985; 248(4 Pt 1):E488-90.

- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. Journal of Nutrition 1935; 10: 63-79.

- McCleery RH, Perrins CM, Sheldon BC, Charmantier A. Age-specific reproduction in a long-lived species: the combined effects of senescence and individual quality. Proc Biol Sci. 2008; 275(1637):963-70.

- Medawar PB. An unsolved problem of biology. HK. Lewis. London. 1952

- Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR, Lithgow GJ. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. Science. 2000; 289(5484):1567-9.

- Menec VH. Relation between everyday activities and successful aging: a 6-year longitudinal study. Journal of Gerontology: Social Sciences, 58(B), 2003.

- Michán S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. J Neurosci. 2010; 30(29):9695-707.

- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. Nature. 1999; 402(6759):309-13.

- Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nelson JF, Orihuela CJ, Pletcher S, Sharp ZD, Sinclair D, Starnes JW, Wilkinson JE, Nadon NL, Strong R. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66(2):191-201.

- Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. Aging (Albany NY). 2011; 3(8):716-32.

- Mittermeier RA, Konstant WR, Hawkins F, Louis EE, Legrand O, Ratsimbafatsy J, Rasoloarison RM, Ganzhorn JU, Rajaobelina S, Tattersall I, and Meyer DM. Lemurs of Madagascar. Conservation International Washington. 1994.

- Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, Chery I, Zahariev A, Zahn S, Stein TP, Sebedio JL, Pujos-Guillot E, Falempin M, Simon C, Coxam V, Andrianjafiniony T, Gauquelin-Koch G, Picquet F, Blanc S. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. FASEB J. 2011; 25(10):3646-60.

- Montgomery MK, Hulbert AJ, Buttemer WA. The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. PLoS One. 2011; 6(8):e24138.

- Moore TL, Killiany RJ, Herndon JG, Rosene DL, Moss MB. Impairment in abstraction and set shifting in aged rhesus monkeys. Neurobiol. Aging. 2003; 24, 125–134.

- Morimoto RI. The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011; 76:91-9

- Moriya J, Chen R, Yamakawa J, Sasaki K, Ishigaki Y, Takahashi T. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. Biol Pharm Bull. 2011; 34(3):354-9.

- Moskalev AA, Shaposhnikov MV. Pharmacological inhibition of phosphoinositide 3 and TOR kinases improves survival of Drosophila melanogaster. Rejuvenation Res. 2010; 13(2-3):246-7.

- Moura LP, Figueredo GA, Bertolini NO, Ceccato M, Pereira JR, Sponton AC, de Mello MA. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. Lipids Health Dis. 2012; 11:2.

- Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, Casadei G, Lewis K, Ausubel Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. FM.Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(27):10414-9.

- Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. Dose Response. 2010; 8(4):478-500.

- Murabito JM, Yuan R, Lunetta KL. The search for longevity and healthy aging genes: insights from epidemiological studies and samples of long-lived individuals. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012; 67(5):470-9.

- N -

- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. The NAD+-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. Cell. 2008; 134(2):329-40.

- Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. Diabetologia 2006 ; 49: 434-441.

- Nelson JF, Karelus K, Bergman MD, Felicio LS. Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. Neurobiol Aging. 1995; 16(5):837-43; discussion 855-6.

- Némoz-Bertholet F, Aujard F. Physical activity and balance performance as a function of age in a prosimian primate (Microcebus murinus). Exp. Gerontol. 2003; 38, 407–414.

- Némoz-Bertholet F, Menaker M, Aujard F. Are age-related deficits in balance performance mediated by time of day in a prosimian primate (Microcebus murinus)? Exp. Gerontol. 2004; 39, 841–848.

- Nunez-Parra A, Pugh V, Araneda RC. Regulation of adult neurogenesis by behavior and age in the accessory olfactory bulb. Mol Cell Neurosci. 2011; 47(4):274-85.

- Nusbaum NJ. Aging and sensory senescence. South Med J. 1999; 92(3):267-75.

- O -

- O'Connor TP, Lee A, Jarvis JU, Buffenstein R. Prolonged longevity in naked mole-rats: age-related changes in metabolism, body composition and gastrointestinal function. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2002; 133(3):835-42.

- Oomen CA, Farkas E, Roman V, van der Beek EM, Luiten PG, et al. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. Front Aging Neurosci. 2009; 1:4.:4.

- Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. Science. 1994; 263(5150):1128-30.

- Ortmann S, Heldmaier G, Schmid J, and Ganzhorn JU. Spontaneous daily torpor in Malagasy mouse lemurs. Die Naturwissenschaften 84: 28-32, 1997.

- Osiewacz HD. Aging in fungi: role of mitochondria in Podospora anserina. Mech Ageing Dev. 2002; 123(7):755-64.

- P -

- Paoli A, Cenci L, Grimaldi KA. Effect of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts and low carbohydrates/high-protein meals on weight, cardiovascular risk factors, body composition and diet compliance in Italian council employees. Nutr J. 2011; 10:112.

- Park DC, Reuter-Lorenz P. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. Annu Rev Psychol. 2009; 60:173-96.

- Park S, Park NY, Valacchi G, Lim Y. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. Mediators Inflamm. 2012; 984643.

- Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effects of obesity on reproduction. Reprod Biomed Online. 2006; 12(5):542-51.

- Patel NV, Gordon MN, Connor KE, Good RA, Engelman RW, Mason J, Morgan DG, Morgan TE, Finch CE. Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. Neurobiol Aging. 2005; 26(7):995-1000.

- Pearl R. The rate of Living. University of London Press, London. 1928

- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metab. 2008; 8:157–168.

- Perret M, Aujard F. Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001; 281: R1925-R1933.

- Perret M, Aujard F, Vannier G. Critical role of daylength in energy balance in a non human primate. Biological clocks, mechanisms and applications. 1998; 415-418.

- Perret M, Aujard F, Vannier G. Influence of daylength on metabolic rate and daily water loss in the male prosimian primate Microcebus murinus. Comp Biochem Physiol. 1998; 119: 981-989.

- Perret M, Aujard F. Aging and biological rhythms in primates. Med Sci (Paris). 2006 Mar;22(3):279-83.

- Perret M, Aujard F. Aging and season affect plasma dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-

S) levels in a primate. Exp Gerontol. 2005; 40(7):582-7.

- Perret M. Change in photoperiodic cycle affects life span in a prosimian primate (Microcebus murinus). J Biol Rhythms. 1997; 12(2):136-45.

- Perret M. Energetic advantage of nest-sharing in a solitary primate, the lesser mouse lemur (Microcebus murinus). J Mammal. 1998; 79: 1095-1102.

- Perret M. Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (Microcebus murinus). Int J Primatol. 1992; 59: 1-25.

- Perret M. Stress-effects in Microcebus murinus. Folia Primatol (Basel). 1982; 39(1-2):63-114.

- Perret, M., 1975. Activité thyroïdienne de Microcebus murinus, influence de la captivité. Mammalia 39, 119–132.

- Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. J Endocrinol. 2010; 205(3):201-10.

- Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. Antioxid Redox Signal. 2009; 11(11):2851-97.

- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature. 2004; 429(6993):771-6.

- Picq JL, Aujard F, Volk A, Dhenain M. Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. Neurobiol Aging. 2012; 33(6):1096-109.

- Picq JL. Aging and social behaviour in captivity in Microcebus murinus. Folia Primatol. 1992; 59, 217–220.

- Picq JL. Etude des aspects comportementaux du vieillissement chez un prosimien, Microcebus murinus. Doctoral Thesis, 1993a; University of Paris.

- Picq JL. Radial maze performance in young and aged grey mouse lemurs (Microcebus murinus). Primates. 1993b; 24, 223–226.

- Picq JL. Effects of aging upon recent memory in Microcebus murinus. Aging. 1995; 7, 17–22.

- Picq JL. Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. Exp. Gerontol. 2007; 42, 223–232.

- Picq JL, Dhenain M. Reaction to new objects in young and aged grey mouse lemurs (Microcebus murinus). J. Exp. Psychol. 1998; 51, 337–348.

- Piper MD, Bartke A. Diet and aging. Cell Metab. 2008; 8(2):99-104.

- Pitsikas N, Carli M, Fidecka S, Algeri S. Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. Neurobiol Aging. 1990; 11(4):417-23.

- Pletcher SD, Macdonald SJ, Marguerie R, Certa U, Stearns SC, Goldstein DB, Partridge L. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted Drosophila melanogaster. Curr Biol. 2002; 12(9):712-23.

- Q -

- Qin W, Chachich M, Lane M, Roth G, Bryant M, de Cabo R, Ottinger MA, Mattison J, Ingram D, Gandy S, Pasinetti GM. Calorie restriction attenuates Alzheimer's disease type brain amyloidosis in Squirrel monkeys (Saimiri sciureus). J Alzheimers Dis. 2006; 10(4):417-22.

- Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT, Puigserver P, Sadoshima J, Deng H, Pedrini S, Gandy S, Sauve AA, Pasinetti GM. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. J Biol Chem. 2006; 281(31):21745-54.

- R -

- Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. Ageing Res Rev. 2008; 7(1):34-42.

- Radespiel U, Zimmermann E. Female dominance in captive grey mouse lemurs (Microcebus murinus). Am J Primatol. 2001; 54: 181-192.

- Radespiel U, Cepok S, Zietemann V, Zimmermann E. Sex-specific usage patterns of sleeping sites in grey mouse lemurs (Microcebus murinus) in northwestern Madagascar. Am J Primatol. 1998; 46: 77-84.

- Radespiel U, Reimann W, Rahelinirina M, Zimmermann E. Feeding ecology of sympatric mouse lemur species in northwestern Madagascar. Int J Primatol. 2006; 27: 311-321.

- Radespiel U, Sarikaya Z, Zimmermann E. Sociogenetic structure in a freeliving noctunal primate population: sex-specific differences in the grey mouse lemur (Microcebus murinus). Behav Ecol Sociobiol. 2001; 50: 493-502.

- Raffaghello L, Safdie F, Bianchi G, Dorff T, Fontana L, et al. Fasting and differential chemotherapy protection in patients. Cell Cycle. 2010; 9: 4474-4476.

- Ramaley JA, Phares CK. Delay of puberty onset in females due to suppression of growth hormone. Endocrinology. 1980; 106(6):1989-93.

- Ramprasath VR, Jones PJ. Anti-atherogenic effects of resveratrol. Eur J Clin Nutr. 2010; 64(7):660-8.

- Ramsey JJ, Colman RJ, Binkley NC, Christensen JD, Gresl TA, Kemnitz JW, Weindruch R.Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. Exp Gerontol. 2000; 35(9-10):1131-49.

- Ranney A, Petro MS. Resveratrol protects spatial learning in middle-aged C57BL/6 mice from effects of ethanol. Behav Pharmacol. 2009; 20:330–336.

- Rapp PR, Amaral DG. Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. Trends Neurosci. 1992; 15, 340–345.

- Rattan SI. Anti-ageing strategies: prevention or therapy? Showing ageing from within. EMBO Rep. 2005; 6 Spec No: S25-9.

- Raz N, Rodrigue KM, Haacke EM. Brain aging and its modifiers: insights from in vivo neuromorphometry and susceptibility weighted imaging. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1097:84-93.

- Raz N, Lindenberger U, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, Williamson A, Dahle C, Gerstorf D, Acker JD. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. Cereb. Cortex. 2005; 15, 1676–1689.

- Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. Antioxid Redox Signal. 2011 ; 14: 275-287.

- Reichwald K, Lauber C, Nanda I, Kirschner J, Hartmann N, Schories S, Gausmann U, Taudien S, Schilhabel MB, Szafranski K, Glöckner G, Schmid M, Cellerino A, Schartl M, Englert C, Platzer M. High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish Nothobranchius furzeri: a new vertebrate model for aging research. Genome Biol. 2009; 10(2):R16.

- Renaud S, de Lorgeril M.Lancet. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.1992; 339(8808):1523-6.

- Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. J. Neurosci. 2003; 23, 3295–3301.

- Reuter-Lorenz PA, Park DC. Human neuroscience and the aging mind: a new look at old problems. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci. 2010; 65(4):405-15.

- Rezzi S, Martin FP, Shanmuganayagam D, Colman RJ, Nicholson JK, Weindruch R. Metabolic shifts due to long-term caloric restriction revealed in nonhuman primates. Exp Gerontol. 2009; 44(5):356-62.

- Richel T. Will human life expectancy quadruple in the next hundred years? Sixty gerontologists say public debate on life-extension is necessary. J Anti-Aging Med. 2003; 6:309–14

- Ridgway ID, Richardson CA, Austad SN. Maximum shell size, growth rate, and maturation age correlate with longevity in bivalve molluscs. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66(2):183-90.

- Ridley RM, Baker HF. A critical evaluation of monkey models of amnesia and dementia. Brain Res. Brain Res. Rev. 1991; 16, 15–37.

- Riedt CS, Buckley BT, Brolin RE, Ambia-Sobhan H, Rhoads GG, et al. Blood lead levels and bone turnover with weight reduction in women. J Expo Sci Environ Epidemiol 2009; 19: 90-96.

- Rikke BA, Johnson TE. Lower body temperature as a potential mechanism of life extension in homeotherms. Exp Gerontol. 2004; 39(6):927-30.

- Rikke BA, Liao CY, McQueen MB, Nelson JF, Johnson TE. Genetic dissection of dietary restriction in mice supports the metabolic efficiency model of life extension. Exp Gerontol. 2010; 45(9):691-701.

- Rikke BA, Yerg JE 3rd, Battaglia ME, Nagy TR, Allison DB, Johnson TE. Strain variation in the response of body temperature to dietary restriction. Mech Ageing Dev. 2003; 124(5):663-78.

- Rippe C, Lesniewski L, Connell M, LaRocca T, Donato A, Seals D. Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. Aging Cell. 2010; 9(3):304-12.

- Robb EL, Winkelmolen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 372:254–259.

- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. Nature. 2005; 434(7029):113-8.

- Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(45):15998-6003.

- Rosano C, Marsland AL, Gianaros PJ. Maintaining brain health by monitoring inflammatory processes: a mechanism to promote successful aging. Aging Dis. 2012; 3(1):16-33.

- Ross CN, Davis K, Dobek G, Tardif SD. Aging Phenotypes of Common Marmosets (Callithrix jacchus). J Aging Res. 2012; 2012:567143.

- Roth GS, Handy AM, Mattison JA, Tilmont EM, Ingram DK, Lane MA. Effects of dietary caloric restriction and aging on thyroid hormones of rhesus monkeys. Horm Metab Res. 2002; 34(7):378-82.

- Roth GS, Ingram DK, Joseph JA. Nutritional interventions in aging and age-associated diseases. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1114:369-71.

- Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Calorie restriction in primates: will it work and how will we know? J Am Geriatr Soc 1999; 47: 896-903.

- Roth GS, Lane MA, Ingram DK. Caloric restriction mimetics: the next phase. Ann N Y Acad Sci 2005; 1057: 365-371.

- Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and successful. Science. 1987: Vol. 237 no. 4811 pp. 143-149

- Rowe JW, Kahn RL. Successful aging. Aging. 1998; 10(2):142-4.

- S -

- Salerian AJ, Saleri NG. Cooling core body temperature may slow down neurodegeneration. CNS Spectr. 2008; 13(3):227-9.

- Sam S, Haffner S, Davidson MH, D'Agostino RB, Sr, Feinstein S, et al. Relation of abdominal fat depots to systemic markers of inflammation in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2009; 32:932–937

- Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using

serial registered magnetic resonance imaging. Arch Neurol. 2003; 60(7):989-94.

- Schilling A. Organisation des sens et communication chez le Microcèbe. Primatologie. 2000; 3: 85-143.

- Schmid J. Sex-specific differences in activity patterns and fattening in the gray mouse lemur (Microcebus murinus) in Madagascar. J Mammal. 1999; 80: 749-757.

- Schmid J. Torpor in the tropics: the case of the gray mouse lemur (Microcebus murinus). Bas Appl Ecol. 2000; 1: 133-139.

- Seguy M, Perret M. Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (Microcebus murinus). J Comp Physiol. 2005; B 175: 107-115.

- Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. FASEB J. 2008; 22(3):807-18.

- Selman C, Withers DJ. Mammalian models of extended healthy lifespan. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011; 366(1561):99-107.

- Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Life Sci. 2002; 71(21):2489-98.

- Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T, Yamaza H. Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. FASEB J. 2003; 17(9):1108-9.

- Shock NW Physical activity and the “rate of ageing”. Canad.Med.Ass.J. 1967.

- Shock NW, Greulich RC, Andres R, Arenberg D, Costa PT, Lakatta EG, Tobin JD. Normal human aging. Nih publication et al., 1984 ? Lindeman RD, Tobin JD, Shock NW. Association between blood pressure and the rate of decline in renal function with age. Kidney Int. 1984; 26(6):861-8.

- Sibley CG, Ahlquist JE. DNA hybridization evidence of hominoid phylogeny: results from an expanded data set. J Mol Evol. 1987; 26(1-2):99-121.

- Singleton RH, Yan HQ, Fellows-Mayle W, Dixon CE. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2010; 27:1091–1099.

- Sitzmann BD, Mattison JA, Ingram DK, Roth GS, Ottinger MA, Urbanski HF. Impact of Moderate Calorie Restriction on the Reproductive Neuroendocrine Axis of Male Rhesus Macaques. Open Longev Sci. 2010; 3(10):38-47.

- Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in Deinococcus radiodurans. Microbiol Mol Biol Rev. 2011; 75(1):133-91.

- Smith DL Jr, Mattison JA, Desmond RA, Gardner JP, Kimura M, Roth GS, Ingram DK, Allison DB, Aviv A. Telomere dynamics in rhesus monkeys: no apparent effect of caloric restriction. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66(11):1163-8.

- Smith DL Jr, Nagy TR, Allison DB. Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research. Eur J Clin Invest. 2010; 40(5):440-50.

- Soare A, Cangemi R, Omodei D, Holloszy JO, Fontana L. Long-term calorie restriction, but not endurance exercise, lowers core body temperature in humans. Aging. 2011; 3: 374-379.

- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science. 1996; 273(5271):59-63.

- Sonntag WE, Csiszar A, deCabo R, Ferrucci L, Ungvari Z. Diverse roles of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in mammalian aging: progress and controversies. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012; 67(6):587-98.

- Speakman JR, Hambly C. Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan. J Nutr. 2007; 137(4):1078-86.

- Stamatakis E, Hamer M. Sedentary behaviour: redefining its meaning and links to chronic disease. Br J Hosp Med (Lond). 2011; 72(4):192-5.

- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. Physiol Rev. 2009; 89(3):1025-78.

- Strawbridge WJ, Wallhagen MI, Cohen RD. Successful aging and well-being: self-rated compared with Rowe and Kahn. Gerontologist. 2002; 42(6):727-33.

- Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. Cell Metab. 2007; 6(4):307-19.

- Suzuki M, Willcox DC, Rosenbaum MW, Willcox BJ. Oxidative stress and longevity in okinawa: an investigation of blood lipid peroxidation and tocopherol in okinawan centenarians. Curr Gerontol Geriatr Res. 2010; 380460.

- Szkudelski T, Szkudelska K. Anti-diabetic effects of resveratrol. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1215:34-9.

- T -

- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence. Mech Ageing Dev. 1981; 17(2):183-94.

- Talan MI, Ingram DK. Age comparisons of body temperature and cold tolerance among different strains of Mus musculus. Mech Ageing Dev. 1986; 33(3):247-56.

- Tannenbaum C, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Platt RW. A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernado Study. Eur. J. Endocrinol. 2004; 151, 717–725.

- Tattersall I. The primates of Madagascar. New York: Columbia University Press, 1982.

- Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. Aging Cell. 2010; 9(5):667-84.

- Terrien J, Ambid L, Nibbelink M, Saint-Charles A, Aujard F. Non-shivering thermogenesis activation and maintenance in the aging gray mouse lemur (Microcebus murinus). Exp Gerontol. 2010; 45(6):442-8.

- Terrien J, Perret M, Aujard F. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. Front Biosci. 2011; 16:1428-44.

- Terrien J, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Henry PY, Perret M, Epelbaum J, Aujard F. Effects of age on thermoregulatory responses during cold exposure in a nonhuman primate, Microcebus murinus. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2008; 295, 696–703.

- Terrien J, Zizzari P, Epelbaum J, Perret M, Aujard F. Daily rhythms of core temperature and locomotor activity indicate different adaptive strategies to cold exposure in adult and aged mouse lemurs acclimated to a summer-like photoperiod. Chronobiol. Int. 2009; 26, 838–853.

- Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A. The short-lived fish Nothobranchius furzeri as a new model system for aging studies. Exp Gerontol. 2007; 42(1-2):81-9.

- Thorén S, Linnenbrink M, Radespiel U. Different competitive potential in two coexisting mouse lemur species in northwestern Madagascar. Am J Phys Anthropol. 2011; 145(1):156-62.

- Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Nature. 2001; 410(6825):227-30.

- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. N Engl J Med. 2003; 348(26):2599-608.

- Trouche SG, Maurice T, Rouland S, Verdier JM, Mestre-Frances N. The three-panel runway maze adapted to Microcebus murinus reveals

age-related differences in memory and perseverance performances. Neurobiol. Learn. Mem. 2010; 94, 100–106.

- U -

- Ulrik Stervbo, Ole Vang, Christine Bonnesen, « A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine », dans Food Chemistry. 2007; 101, 449-457.

- Ungvari Z, Sonntag WE, de Cabo R, Baur JA, Csiszar A. Mitochondrial protection by resveratrol. Exerc Sport Sci Rev. 2011; 39(3):128-32.

- Uno H, Poff B. Coronary arterial ectasia, a predominant type of coronary sclerosis in aged captive rhesus monkeys (Macaca mulatta). Am J Pathol. 1983; 111(3):315-22.

- Uno H, Walker LC. The age of biosenescence and the incidence of cerebral beta-amyloidosis in aged captive rhesus monkeys. Ann N Y Acad Sci. 1993; 695:232-5.

- V -

- Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. Circ Res. 2008; 102(6):703-10.

- Valdois S, Joanette Y, Poissant A, Ska B, Dehaut F. Heterogeneity in the cognitive profile of normal elderly. J. Clin. Exp. Neuropsychol. 1990; 12, 587–596.

- Valenzano DR, Terzibasi E, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Aging Cell. 2006; 5(3):275-8.

- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol. 2006; 16(3):296-300.

- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol. 2006; 16:296–300.

- Van Someren EJ, Riemersma-VanDerLek RF. Live to the rhythm, slave to the rhythm. Sleep Med. Rev. 2007; 11, 465–484.

- Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. BMC Cancer. 2010; 10:238.

- Vanfleteren JR, Braeckman BP. Mechanisms of life span determination in Caenorhabditis elegans. Neurobiol Aging. 1999; 20(5):487-502.

- Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, Das DK, Delmas D, Gottfried C, Lin HY, Ma QY, Mukhopadhyay P, Nalini N, Pezzuto JM, Richard T, Shukla Y, Surh YJ, Szekeres T, Szkudelski T, Walle T, Wu JM. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. PLoS One. 2011; 6(6):e19881.

- Vasanthi HR, Parameswari RP, DeLeiris J, Das DK. Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. Front Biosci (Elite Ed). 2012; 4:1505-12.

- Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. Nature. 2008; 454(7208):1065-71.

- Villalba JM, Alcaín FJ. Sirtuin activators and inhibitors. Biofactors. 2012.

- Vítek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. Front Pharmacol. 2012; 3:55.

- Vitetta L, Anton B, Cortizo F, Sali A. Mind-body medicine: stress and its impact on overall health and longevity. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1057:492-505.

- Vogt G. How to minimize formation and growth of tumours: potential benefits of decapod

crustaceans for cancer research. Int J Cancer. 2008; 123(12):2727-34.

- Vogt G. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. Biogerontology. 2010; 11(6):643-69

- W -

- Wallace HM, Fraser AV. Inhibitors of polyamine metabolism: review article. Amino Acids. 2004; 26(4):353-65.

- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metab Dispos. 2004; 32:1377–1382.

- Wang J, Michelitsch TM, Wunderlin A, Mahadeva R. Aging as a consequence of misrepair. A novel theory of Aging.Quantitative Biology. Tissues andOrgans. 2009.

- Wang Y, Oh SW, Deplancke B, Luo J, Walhout AJ, Tissenbaum HA. C. elegans 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. Mech Ageing Dev. 2006; 127(9):741-7.

- Weindruch R, Gottesman SR, Walford RL. Modification of age-related immune decline in mice dietarily restricted from or after midadulthood. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982; 79(3):898-902.

- Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA. Effects of caloric restriction on gene expression. Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme. 2002; 6:17-28; discussion 28-32.

- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. J Nutr. 1986; 116(4):641-54.

- Weindruch R. Dietary restriction, tumors, and aging in rodents. J Gerontol. 1989;44(6):67-71.

- Weiss EP, Fontana L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 301(4):H1205-19.

- Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. Science. 2002; 296(5568):695-8.

- Willette AA, Bendlin BB, Colman RJ, Kastman EK, Field AS, Alexander AL, Sridharan A, Allison DB, Anderson R, Voytko ML, Kemnitz JW, Weindruch RH, Johnson SC. Calorie restriction reduces the influence of glucoregulatory dysfunction on regional brain volume in aged rhesus monkeys. Diabetes. 2012; 61(5):1036-42.

- Williams GC. Pleiotropy. Natural selection and the evolution of senescence. Evolution 1957; 11:398-411

- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature. 2004; 430:686–689.

- Woodcock J, Franco OH, Orsini N, Roberts I. Non-vigorous physical activity and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis of cohort studies. Int J Epidemiol. 2011; 40(1):121-38.

- Wright PC. Lemur traits and Madagascar ecology: coping with an island environment. Am J Phys Anthropol Suppl. 1999; 29: 31-72.

- Wu A, Sun X, Liu Y. Effects of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. Neurosci Lett. 2003; 339(2):166-8.

- Y -

- Yamaguchi M, Jie Z. Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro. Biol Pharm Bull. 2001; 24(12):1437-9.

- Yamaguchi T, Miyashita Y, Saiki A, Watanabe F, Watanabe H, Shirai K. Formula diet is effective for the reduction and differentiation of visceral adipose tissue in Zucker fatty rats. J Atheroscler Thromb. 2012; 19(2):127-36.

- Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. Neurobiol Aging. 2004; 25(3):325-32.

- Yoder AD, Burns MM, Zehr S, Delefosse T, Veron G, Goodman SM, and Flynn JJ. Single origin of Malagasy Carnivora from an African ancestor. Nature. 2003; 421: 734-737.

- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, et al. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. Brain Res. 2009; 1250:242–253.

- Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. J Gerontol. 1985; 40(6):657-70.

- Yuan R, Peters LL, Paigen B. Mice as a mammalian model for research on the genetics of aging. ILAR J. 2011; 52(1):4-15.

- Yuan R, Tsaih SW, Petkova SB, Marin de Evsikova C, Xing S, Marion MA, Bogue MA, Mills KD, Peters LL, Bult CJ, Rosen CJ, Sundberg JP, Harrison DE, Churchill GA, Paigen B.Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. Aging Cell. 2009; 8(3):277-87.

- Z -

- Zelenka J, Muchova L, Zelenkova M, Vanova K, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. Biochimie. 2012; 94(8):1821-7.

- Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab 2009; 9: 407-416.

- Zimmermann E, Cepok S, Rakotoarison N, Zietmann V, Radespiel U. Sympatric mouse lemurs in North-West Madagascar: a new rufous mouse lemur species (Microcebus ravelobensis). Int J Primatol. 1998; 69: 106-114.

Annexes

Annexe A

Articles relatifs au sujet de thèse

Ageing Research Reviews xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Ageing Research Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/arr

Review

The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies

S. Languille[a], S. Blanc[b], O. Blin[c], C.I. Canale[a], A. Dal-Pan[a], G. Devau[d], M. Dhenain[e], O. Dorieux[a,e], J. Epelbaum[f], D. Gomez[a], I. Hardy[a], P.-Y. Henry[a], E.A. Irving[g], J. Marchal[a], N. Mestre-Francés[d], M. Perret[a], J.-L. Picq[a,h], F. Pifferi[a], A. Rahman[a], E. Schenker[i], J. Terrien[a], M. Théry[a], J.-M. Verdier[d], F. Aujard[a,*]

[a] CNRS UMR 7179, MNHN, 1 Av du Petit Château, Brunoy, France
[b] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg, Strasbourg, France
[c] Institut Neurosciences Timone UMR, CIC-CPCET, Marseille, France
[d] INSERM U710, Université Montpellier 2, Montpellier, EPHE, Paris, France
[e] CEA, DSV, I2BM, MIRCen, URA CEA CNRS 2210, 18 Rte du Panorama Fontenay-aux-Roses Cedex, France
[f] Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences, UMR-S 894 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France
[g] GlaxoSmithKline R&D Ltd., Stevenage, United Kingdom
[h] Laboratoire de Psychopathologie et de Neuropsychologie, EA 2027, Université Paris 8, 2 Rue de la Liberté, St-Denis, France
[i] Institut de Recherches Servier, 3 rue de la République, Suresnes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 May 2011
Received in revised form 4 July 2011
Accepted 8 July 2011
Available online xxx

Keywords:
Ageing
Age-related disease
Lifespan
Microcebus murinus

ABSTRACT

The use of non-human primate models is required to understand the ageing process and evaluate new therapies against age-associated pathologies. The present article summarizes all the contributions of the grey mouse lemur *Microcebus murinus*, a small nocturnal prosimian primate, to the understanding of the mechanisms of ageing. Results from studies of both healthy and pathological ageing research on the grey mouse lemur demonstrated that this animal is a unique model to study age-dependent changes in endocrine systems, biological rhythms, thermoregulation, sensorial, cerebral and cognitive functions.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ageing seems to be the only available way to live a long life.
Auber, Daniel Francois Esprit

1. Introduction

Over the last century, human life expectancy has dramatically increased and the number of aged individuals is still rising. This trend results in the development of great public and scientific concern in ageing, as well as in a demand for strengthening the research effort on the mechanisms responsible for the ageing processes, and on the methods that could prevent age-related diseases.

Along with age, a series of physiological and morphological changes progressively transform young healthy adults into older adults exhibiting increased risks for expressing a wide range of potentially lethal diseases, but also for several kinds of disabilities, which are limiting facets of daily living. The ageing process, observed in virtually all organisms (including unicellular organisms, as yeast), is a complex biological phenomenon which needs to be understood notably for the possible benefits for humans.

Non-human primates are at the crossroad between genetic models (such as *Drosophila melanogaster* and inbred mouse strains), non-transgenic rodent models, and human beings, and constitute indispensable models for physiological and biochemical research on ageing. For ageing research, non-human primate models are more relevant to human ageing than classical biological models, such as rodents (Lavery, 2000), for two reasons: (i) they share several genetic, physiological, and anatomical similarities (a complex nervous system in particular) with humans, (ii) they mimic the heterogeneity observed in the human population. Moreover, they can be studied under controlled experimental conditions more easily than humans.

This review focuses on ageing of a non-human primate model: the grey mouse lemur, *Microcebus murinus* that will be referred to as "mouse lemurs" throughout the review. Using mouse lemurs has several advantages in ageing research with regard to using other non-human primates: (1) relatively shorter lifespan (8–12 years),

* Corresponding author at: Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, 1 avenue du Petit Château, 91800 Brunoy, France. Tel.: +33 1 60 47 92 37.
E-mail address: aujard@mnhn.fr (F. Aujard).

1568-1637/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

implying that ageing in mouse lemurs can be observed faster than in other primates (e.g., rhesus macaques, which live approximately 35 years); (2) small size (body length ~12 cm, ~60–120 g), rapid maturity (first year) and relative high fecundity for a non-human primate (gestation: two month and weaning: two months; 1–3 offspring per litter) (Perret, 2005); (3) housing and dietary knowledge of mouse lemurs afford optimal living conditions and ease of maintenance in the laboratory; (4) environmental manipulations can alter lifespan (Perret, 1997); (5) information already available on ageing (present review). Moreover, mouse lemurs are exceptionally long-lived relatively to mammals of similar size; they live up to two-three times longer than mammals of equivalent body mass (Stuart and Page, 2010), suggesting that mouse lemurs could be used to address key questions about basic ageing processes. Finally, mouse lemurs are photoperiod-dependent animals, expressing marked seasonal rhythms in response to seasonal alternation of long day lengths (>12 h/day) and short day lengths (<12 h/day); this last feature allows for the study of adaptive responses under different photoperiodic conditions.

The present review aims at regrouping the major results of all studies on mouse lemurs ageing, and to update and complete earlier longevity data on this primate as previously described by Perret (1997). In humans, ageing is associated with changes in appearance, sensory and motor impairment, declines in sexual activity, endocrine modifications, declines in metabolism and thermoregulation, declines in cardiovascular, respiratory and immune functions, and impairment of certain memory functions (Lata and Alia, 2007). We will focus on several biological systems which are impaired in lemurs, as in humans: the sensori-motor system, the endocrine systems, the biological clock, thermoregulative system, and cerebral and cognitive functions.

2. Longevity

Per year, the Brunoy breeding colony averages about 500 mouse lemurs of various ages, originating from wild animals from south Madagascar 40 years ago. All studied mouse lemurs were laboratory born, and maintained under constant conditions of ambient temperature (24–26 °C) and relative humidity (55%). To control seasonal and daily rhythms of mouse lemurs, an artificial photoperiodic regimen was used consisting in alternating 26 week-period of short day lengths (10 h light/day, Malagasy winter-like photoperiod) and 26 week-period of long day lengths (14 h light/day, Malagasy summer-like photoperiod). The shift from one photoperiod to another was given without transition. Light was provided by cool fluorescent lamps (250–350 lux) and a dim red or blue light (about 0.002 lux) was provided during the dark phase. Animals were fed with fresh fruit, milky mixture (eggs, cereals, milk cheese and honey bread) and meal worms (~23–29 calories/day animal in short and long photoperiod respectively). Mouse lemurs were housed in a controlled social environment. Cages of different sizes (from ~1 to 6 m^3), provided with many supports (wooden branches, flexible cords) and wooden nests were used: the largest cages for groups (6–8 animals) either during sexual competition or during winter rest, the smaller for isolated animals (pregnant or lactating females, scientific experiments, injury). In a general way, except obviously during period of required sexual competition and breeding, sexes were maintained separated to avoid intra-sexual competition. To ensure breeding, heterosexual groups (2–3 females with 3 males) were constituted only for a short period (3–5 weeks) during the long day lengths. Body mass and health status were controlled at least once a month, and necropsies were performed in all animals that died spontaneously.

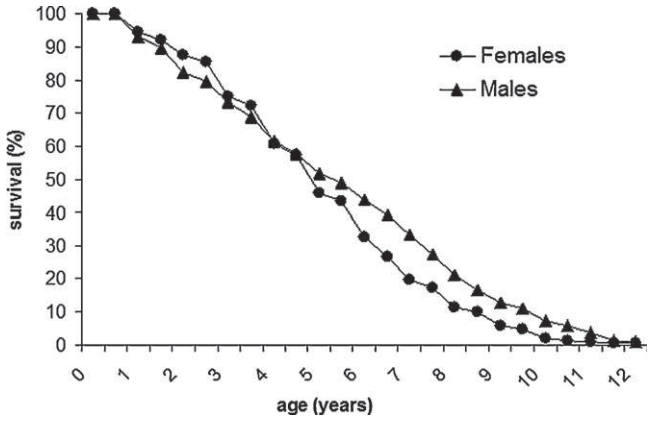


Fig. 1. Survival curve from 643 mouse lemurs (361 females and 282 males) of the Brunoy colony.

We have analyzed longevity of 643 mouse lemurs (361 females and 282 males) which were born and died in the laboratory (Fig. 1). The median survival time, time at which half of the population has died, is generally used to delineate the adult and aged portions of a population. In this colony, the median survival time of mouse lemurs is 4.9 years for females and 5.7 years for males. At 5/6-year-old, morphological modifications suggest ageing: bleaching of the fur of the face, belly and back, shortening of the snout and thickening of the border of the ear auricle (Fig. 2). Thus, for the sake of simplicity, we consider mouse lemurs younger than 5 years as adult animals, and older than 6 years as aged animals.

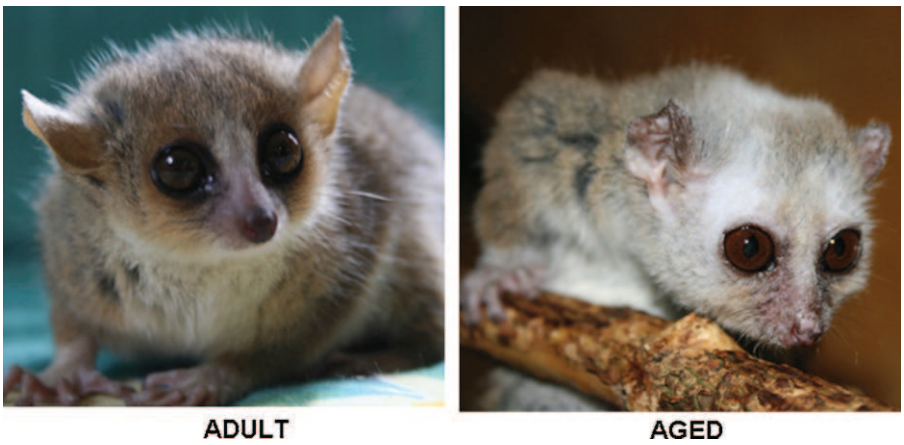


Fig. 2. Representative pictures of an adult and an aged mouse lemur.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

In the wild, animals rarely live to their maximum lifespan because they are exposed to several causes of death that do not exist in captivity (e.g., predation, food restriction, parasitism). In our laboratory, the maximum recorded lifespan is 12 years. The mean lifespan of the top 10% of the oldest individuals is shorter in females than in males (9.9 ± 0.2 and 11.0 ± 0.2 years, respectively; $t(62) = 4.6$, $p < 0.0001$). Interestingly, whatever their age, mortality of mouse lemurs depends on both sex and period of the year (short versus long day length): 72% of females and 59% of males die during long day length (comparison long versus short day length; females: $\chi^2 > 20$, $p < 0.0001$; males: $\chi^2 = 10.8$, $p = 0.001$; comparison females versus males: $\chi^2 = 11.7$, $p < 0.001$). High mortality rate during the reproductive period (long day length) and sex-difference in lifespan may be linked to reproductive pressure. In adults, death was mainly due to complications resulting from wounds. In aged individuals, rare cases of cancers were observed and most of the deaths can be attributed to progressive renal insufficiency (chronic nephrosis with nephritis) leading to respiratory insufficiency.

3. Phenotypes of aged mouse lemurs

3.1. Age-associated alterations of the sensorial system

3.1.1. Vision and ageing

The mouse lemur has an intriguing visual system which is interesting to explore for potential ageing effects. This nocturnal species shows a series of adaptations that improve photon capture under low levels of illumination: eye characteristics such as large globe and pear-shaped pupil are completed by an extensive tapetum which improves photon capture but likely at the expense of visual resolution (Dkhissi-Benyahya et al., 2001). Yet, no retinal abnormality has been observed in the eyes of adult and aged animals: the thickness and morphology of both the outer nuclear layer and the photoreceptor layer seemed well preserved suggesting no sign of retinal degeneration or atrophy, at least from an histological point of view (Beltran et al., 2007). A precise neurophysiological investigation would be required to examine whether age may affect the abundance and distribution of photoreceptors as well as their efficiency in light reception.

Cataract is the ocular lesion most frequently encountered in old mouse lemurs. An ophthalmological survey of 220 animals of all ages from two captive colonies has revealed the high incidence of this lesion, with nearly half of the old adults affected (Beltran et al., 2007). The youngest age at which lens opacities have been diagnosed is 3.5 years and the earliest age-group in which a majority of animals had cataracts is the 7–8-year group. Cataract is predominantly bilateral and progresses slowly with age. Other cataract-associated lesions are also observed such as hyphema, posterior synechiae, pupil seclusion, corneal degeneration or buphthalmia. Cataractogenesis can be caused by a diverse array of factors among which trauma, dietary and metabolic disorders (imbalance in amino-acids, sugars or vitamins), parasites, ocular inflammation, toxic substances, hereditary factors and ageing (Beltran et al., 2007). While proximate factors have not been yet identified in the mouse lemur, ageing is recognized as being a major risk factor for human cataract development (Rathbun and Holleschau, 1992). Because of potential help to understand the mechanisms of cataract formation in humans, the proximate role of oxidative stress has been studied in more detail in the mouse lemur. Age-related changes of the metabolic pathways of glutathione, a key component of the anti-oxidative system, have been demonstrated in mouse lemurs. As in humans, glutathione-synthetase activity decreases and glutathione-peroxidase activity increases with age in the lens of mouse lemurs. Nevertheless, the metabolic control of glutathione cycle in the mouse lemur differs from that of Old World simians including humans in some areas; for instance the glutamyl-cysteine synthetase activity increases with age in mouse lemurs, while activity of this enzyme decreases in Old World simians (Rathbun and Holleschau, 1992; Holleschau and Rathbun, 1994). The influence of glutathion cycle on cataract formation remains to be investigated in the mouse lemur.

3.1.2. Olfaction and ageing

The mouse lemur has highly developed sensory modalities to ensure adaptive locomotor and feeding behaviors in dense forest biotope (e.g., jumping, climbing, capture of insects) but also social communication between solitary, nocturnal living individuals. In this species, the sense of smell is of high relevance for the modulation of both behavioral and physiological functions (Schilling et al., 1984; Aujard, 1997). Social communication mainly relies on chemical signals actively dispersed by mouse lemurs through typical marking behaviors such as urine-washing (Schilling and Perret, 1987). Chemosensory structures include large olfactory bulbs and a functional vomeronasal organ. These structures are especially developed reaching more than 2.6% of the cerebral mass, and represent the greatest olfactory surface in proportion compared to other primates (Smith et al., 2007). Moreover, this species provides the unique example within primates so far of the presence of true pheromones acting on sexual physiology (Schilling et al., 1984). Some elements from behavioral studies are already in favor of an altered chemosensory system in the aged mouse lemurs. First, males show with age a decrease in the frequency of sniffing and licking of the genitalia of receptive females and a decrease in the frequency of scent marking behaviors (Aujard and Perret, 1998). Second, similar behavioral and social communication patterns are observed in adult males deprived of either their vomeronasal organ (Aujard, 1997) or their main olfactory bulb (Araujo, 2003). A chemosensory discrimination test based on the discrimination between water and an odorant repellent surrounding food reveals a progressive decline in olfactory sensitivity with age (Aujard and Némoz-Bertholet, 2004). When exposed to the volatile phase of urine from proestrus females, aged mouse lemurs fail to exhibit the increase in testosterone level that is classically observed in adult males (Aujard and Némoz-Bertholet, 2004). Further investigations at the central level reveal that proestrus urine odor exposure induces Fos expression in the different cell layers of the main olfactory bulbs in adult mouse lemurs, whereas Fos expression is not increased by the odorant stimulation in aged individuals (Cayetanot et al., 2005b). This confirms that the lack of pheromonal effect on the sexual function of aged male mouse lemurs is clearly related to a lack of pheromonal input from the main olfactory system to the central nervous system. Taken together, these data constitute the first demonstration of a clear impairment of olfactory information processing in an aged non-human primate.

3.2. Motor function and ageing

In humans, motor capacities and balance decrease with increasing age. In mouse lemurs, aged animals move with greater difficulty (Némoz-Bertholet and Aujard, 2003). Motor coordination and endurance, measured by placing an animal on an accelerating rotating rod, is also impaired with age. From 4 year-old, balance performance decreases progressively (Némoz-Bertholet and Aujard, 2003). This age-related decrease is observed only during long day length, since both adult and aged performances are poor during short day length (Némoz-Bertholet et al., 2004).

3.3. Socio-sexual behavior and ageing

Decrease in social interactions with age has been frequently described in primates (Davis, 1978; Heydecke et al., 1986). In the mouse lemur, old animals remain attractive partners for mates, but

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

show an active withdrawal from social interactions (Picq, 1992). During the breeding season, old mouse lemurs exhibit less sexual and aggressive behaviors than younger animals but they outrank younger males (except when they reach the oldest age, >9 years), in reaching dominant positions, increasing their reproductive success (Aujard and Perret, 1998).

4. Age-associated alterations of biological rhythms

4.1. Daily rhythms and ageing

In humans, daily rhythms of sleep, thermoregulation and hormonal secretion are severely altered with ageing. Ageing is associated with changes in amplitude and temporal organization of many daily rhythms (Van Someren and Riemersma-VanDerLek, 2007). Although mouse lemurs are nocturnal, the rest-activity rhythm becomes fragmented in aged mouse lemurs (Aujard et al., 2006a), as in humans. Mouse lemurs exhibit very marked circadian rhythms with high levels of locomotor activity during the dark period and almost complete rest during the light period (Perret and Aujard, 2001). Aged animals show a significant increase in daily variability and an advance in activity onset compared to adult animals. Furthermore, in absence of timing cues (i.e., with constant dim red light), aged mouse lemurs exhibit a shortening of the free-running period compared to adult animals (Cayetanot et al., 2005a, 2009), suggesting that ageing affects the regulation of the central clock.

The daily locomotor activity patterns change between periods of short or long day lengths. Although some age-related differences in the locomotor activity rhythm can be observed under exposure to short day length, they are predominant under long day length (Aujard et al., 2007). Some mechanisms allowing adaptation to changing day length thus seem to be impaired with ageing. Conversely to adult animals, the pattern of urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion (index of melatonin production) is significantly altered in aged mouse lemurs which do not show the classical nocturnal peak (Aujard et al., 2001). This strongly suggests that aged mouse lemurs lack efficient entrainment to annual photoperiod variations. This is corroborated by the age-related decreased amplitude in seasonal variations of most biological functions (e.g., body mass, resting metabolic rate, sexual hormones) studied so far in the mouse lemur (Aujard et al., 2001; Perret and Aujard, 2006).

4.2. Central clock and ageing

The main central clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus whose endogenous oscillations are mainly entrained by light. Light is transmitted primarily via the retino-hypothalamic tract, which terminates in the ventral part of the SCN, where vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons and calbindin-containing neurons are located (Antle and Silver, 2005). VIP cells are mainly intrinsic and project to the dorsal part of the SCN, where neurons containing arginine-vasopressin (AVP) reside. Calbindin cells are involved in the control of circadian rhythmicity (Kriegsfeld et al., 2004). In the SCN, cellular function and sensitivity to light show drastic changes with age in the mouse lemur. In adult animals, VIP-positive and AVP-positive SCN neurons exhibit daily rhythms of their secretion: AVP immunoreactivity peaks during the second half of the day, and VIP peaks during the night. In aged mouse lemurs, the peaks of AVP and VIP immunoreactivity are significantly shifted, so that AVP is most intense at the beginning of the night, whereas VIP peak at the beginning of daytime (Cayetanot et al., 2005a). In adult animals, calbindin-positive SCN neurons do not exhibit daily rhythms in their number or intensity, but exhibit significant daily variations in the percentage of cells with a calbindin-positive nucleus, characterized by high values during the daytime and low values during the night. Immunoreactive intensity peaks in the middle of the daytime. During ageing, calbindin expression in the nuclei of calbindin cells in the SCN tends to be modified. The amplitude of daily variation in calbindin expression is dampened, with a lower immunointensity during the daytime and a delayed decrease during the night. These changes seem to affect the ability of the SCN to transmit rhythmic information to other neural target sites, and thereby to modify the expression of some biological rhythms (Cayetanot et al., 2007).

The cellular response to photic inputs in the SCN of aged mouse lemurs also exhibits dramatic changes. SCN neuronal activations evaluated by Fos expression is reduced by 88% in the SCN of aged mouse lemurs following exposure to low levels of irradiance. Exposure to higher irradiance levels shows similar results, with a reduction of 66% in Fos expression in aged animals (Aujard et al., 2001). Taken together, these results highlight a deficit in transduction of the light signal to target areas with ageing.

4.3. Seasonal rhythms and ageing

Long-term acceleration of seasonal rhythms (i.e., experimental shortening of season and year duration) affects survival and longevity in mouse lemurs (Perret, 1997). In captivity, acceleration of seasonal rhythms is obtained by exposing the animals to alternating periods of long and short days over a periodicity shorter than a year (8 or 5 months). Independent of sex, the mean lifespan was shortened in mouse lemurs exposed during their whole life to an accelerated photoperiodic cycle of 8 months compared to animals that lived under an annual photoperiodic cycle (Perret, 1997). This reduction of about 30% of lifespan is not accompanied by a desynchronization of biological rhythms under photoperiodic control and is not related to an increase in reproduction or in duration of time spent in active conditions. However, when the number of seasonal cycles experienced by an individual is considered rather than chronological age, the mean lifespan is 5 seasonal cycles and maximum survival reaches 9–10 cycles, independent of sex or photoperiodic regimen (Perret, 1997).

In animals exposed to 3- to 5-years of accelerated seasonal photoperiodic rhythm ("annual" duration of 5 months), disturbances of the locomotor activity rhythm are observed, that resemble those of aged mouse lemurs, whereas animals are studied in entrained or in free-running conditions (Cayetanot et al., 2005a). Animals exposed to artificially accelerated ageing exhibit the same alterations in melatonin production and Fos response to light than animals that have been maintained in a routine photoperiodic cycle (Aujard et al., 2001). These results suggest that in mouse lemurs, as in other seasonal mammals, longevity depends on the expression of a fixed number of seasonal cycles rather than on a fixed biological age.

4.4. Biological rhythms, immune system and ageing

Human ageing can be associated with a reduction in acquired immune responses accompanied by elevated levels of pro-inflammatory cytokines (Nikolich-Zugich, 2005)). Recent findings suggest that interferon-γ (IFN-γ) can affect the function of the SCN, both *in vitro* and *in vivo* (Ohdo et al., 2001; Sadki et al., 2007; Palomba and Bentivoglio, 2008). The magnitude of age-related disturbances in biological rhythms is correlated with the plasma level of IFN-γ shown to increase with age in the mouse lemur. Most remarkably, increased levels of IFN-γ correlate positively with longevity in mouse lemurs (Cayetanot et al., 2009). These results in mouse lemurs demonstrate that the degree of circadian rhythm alterations in an individual is correlated with plasma IFN-γ levels during ageing, and that plasma IFN-γ levels may pre-

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

dict ageing. Although only correlative, these results indicate that anti-inflammatory molecules may have the potential to regulate circadian rhythms in the elderly.

5. Age-associated alterations of the thermometabolic system

The mouse lemur offers a potentially unique model to investigate the thermometabolic system owing to several particularities. First, the mouse lemur shows a strong seasonal cycle of body mass and physical activity. Body mass and energy intake are maximal in winter when resting metabolic rate is down due to low thyroid and gonad activities. The orexigenic ghrelin hormone is involved in the seasonal body mass gain (Giroud et al., 2009). Second, one particularity of the mouse lemur is the use of daily torpor (daily decrease in body temperature during the first half of the diurnal phase) to further save energy during the period of limited resource availability of the winter season (Giroud et al., 2008; Canale et al., 2011). This confers a great plasticity in energy balance regulation in order to face both seasonal and non-seasonal unfavorable conditions, be they linked to food availability (energy challenge, Séguy and Perret, 2005; Giroud et al., 2008; Canale et al., 2011) or physical conditions (temperature challenge, Terrien et al., 2008, 2009a). Studies conducted on adult mouse lemurs converge to the idea of a great energy flexibility and demonstrate (1) the efficiency of torpor as an energy saving mechanism, (2) the strong influence of photoperiod on thermoregulation and energy balance regulation (Giroud et al., 2008) and (3) the capacity to use either protein or fat sparing strategies in response to the constraints of the environment of a given season (Giroud et al., 2010). Although the use of torpor and the strong seasonality of the mouse lemur confer specificities to study thermoregulation in this heterothermic primate, it can provide a powerful basis to study ageing of the thermometabolic system. Indeed, the maintenance of an equilibrated energy balance is critical but complex in the elderly (Morley, 1990; Meydani, 2001; Ritz, 2001).

5.1. Thermal challenges and ageing

In response to cold exposure, aged mouse lemurs exhibit increased frequency of deep torpor as compared to adult animals (Terrien et al., 2008). The greater occurrence of very low body temperature values is combined with decreased body mass without impairment of body composition. Furthermore, aged animals show a negative correlation between high rates of torpor use and low levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Terrien et al., 2008), a growth factor that has been proposed to be involved in non-shivering process (Yamashita et al., 1994; Duchamp et al., 1997). Taken together, these results suggest that aged mouse lemurs exhibit great difficulty facing cold exposure, inducing very low levels of body temperature. Such impairment induces high rates of energy expenditure, ultimately leading to energy imbalance. It is noteworthy that these results were obtained with animals during the short day length period. In aged mouse lemurs in the long day length period, cold exposure does not induce the occurrence of deep torpor (Terrien et al., 2009a). These results highlight the strong effect of photoperiod on thermoregulatory capacity in the aged mouse lemur. Ability of the aged mouse lemur to maintain normothermia during long but not short day length could be due to indirect thermogenic effect of reproductive status (e.g., sexual steroids levels).

5.2. Energy metabolism and ageing

Exposure to low ambient temperatures ultimately induces increased energy expenditure (Gordon, 1990), reflecting the greater needs for body heat production. Consequently, animals increase their food intake to compensate high rates of energy metabolism and be able to fuel the thermogenesis processes (Balasko et al., 2006). In heterotherms, a trade-off between the energy saved during daily drop in body temperature and the energy cost of arousal ensures the maintenance of an equilibrated energy balance. In the mouse lemur, ageing significantly affects such a trade-off during cold-induced energy stress and alters the energetics of daily heterothermia.

Under short day length, ageing is associated with increased levels of energy expenditure during cold exposure, in concomitance with impaired energy balance. Interestingly, increased energy expenditure and depth of hypothermia phases are strongly correlated. Consequently, high energy needs are induced in the ageing mouse lemur exposed to cold, leading to great energy expenditure levels and making the torpor a counterproductive mechanism (Terrien et al., 2009b). Among heat-production mechanisms, non-shivering thermogenesis (NST) is of major importance in heterotherm species, including the mouse lemur (Genin et al., 2003). The enhancement of this process during cold exposure could be at the origin of energy imbalance in aged mouse lemurs. In reference conditions, the ability to activate NST is preserved during ageing as morphology of brown-adipose tissue and presence of uncoupling protein 1 (mitochondrial protein of brown-adipose tissue) do not differ between adult and aged mouse lemurs (Terrien et al., 2010a). Also, the pharmacological activation of NST reveals similar increased levels of O_2 consumption in adult and aged animals, confirming that no age effect can be evidenced on NST activation in reference conditions. However, the pharmacological activation of NST reveals an impaired evacuation of the excess body heat in aged animals, associated with increased energy expenditure. Thus, ageing seems to be related to decreased capacities in the maintenance of NST rather than to its activation. Energy mobilization could be impaired in the ageing mouse lemur but remains to be demonstrated.

5.3. Behavioral thermoregulation and ageing

In addition to autonomic thermoregulation, animals have the possibility to adjust their behavior to compensate for their physiological failures, and maintain normothermia (Gordon, 1985, 1987). Behavioral adjustments (such as nest sharing and huddling) are very useful to save energy and are widely used in mammal species (Gilbert et al., 2010; Terrien et al., 2011). Ageing affects behavioral thermoregulation in humans (Taylor et al., 1995). When animals are exposed to a choice among different ambient temperatures, aged mouse lemurs prefer warmer nests than adults. Thermal preference is dependent on photoperiod (Aujard et al., 2006a, 2006b; Terrien et al., 2010b) and sex (Terrien et al., 2010b). Actually, such behavior is particularly used in short day length, corresponding to the resting season, and could help animals to face low levels of available energy in the wild. Adults acclimated to long day length, and particularly males, choose colder nests, thus probably avoiding any possible hyperthermia occurrence. Indeed, steroid levels are very high in long day length and participate to maintain thermogenesis at a high level, thus decreasing the needs for behavioral adjustments. The seasonal effect is not maintained with age. With further experiments to accurately assess the occurrence of physiological changes, behavioral thermoregulation could be used as an early marker of ageing to predict the onset of disruption in energy homeostasis balance.

6. Age-associated alterations of the endocrine system

Maintenance of homeostasis involves both the central nervous system and the endocrine system. It is well known that age-related

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

changes in the central nervous system include disorders particularly marked in the hypothalamus, hippocampus and the limbic system with modifications of neurotransmitters and neuro modulatory molecules (McEwen, 2002). Age-related changes in secretion and metabolism of various hormones have been already described. Their interpretation remains difficult considering the multiple hormonal deregulations occurring with age and the great inter-individual variability of the ageing processes (Epelbaum, 2009; Maggio et al., 2010; Barzilai and Gabrieli, 2010).

6.1. Hypothalamo–pituitary–somatotroph axis and ageing

The declining activity of the growth hormone (GH)-IGF-1-axis with ageing plays a role in the development of frailty and in several pathological conditions commonly observed during ageing, such as atherosclerosis, cardiovascular disease and cognitive decline (for review, see Smith et al., 2005). At the same time, a second body of evidence indicates that decreased insulin and IGF-1-like signaling is associated with increased lifespan in fruit flies and nematodes (Kenyon, 2010). More recently, rodent models with reduced GH and/or IGF-1 signaling have also been reported to have extended lifespan (Gontier and Holzenberger, 2010), though such findings are not yet available in the human species (e.g., Aguiar-Oliveira et al., 2010; Guevara-Aguirre et al., 2011). In the mouse lemur, IGF-1 levels have been assessed in order to determine if they were related to the rate of survival of this seasonal species. Cross-sectional blood samplings on 112 males of various ages indicated that IGF-1 levels remain high and constant during the long-day, breeding season, while a significant age-related decrease occurs from the 4th short-day, resting season onward. Interestingly, in 4 year-old lemurs, the ratio of IGF-1 to body mass in short day lengths appears as a good predictor of the animals' lifespan (Aujard et al., 2010).

6.2. Hypothalamo–pituitary–gonadal axis and ageing

Age-related changes in reproductive function have been extensively studied in primates, including humans. Classically, in both sexes, levels of sexual hormones decrease and daily rhythms of sexual hormones are of lower amplitude with age (Brock, 1991; Morley et al., 1997; Goncharova and Lapin, 2004). In mouse lemurs, the reproductive function is highly seasonal with a complete pause of gonadal and sexual hormones secretions in both sexes during the 6 month-period of non-breeding season. In both sexes, seasonal variations of the reproductive function are maintained even in aged individuals. However, levels of sex hormones, testosterone and estrogens, progressively decrease during the breeding season (Aujard and Perret, 1998; Perret, 2005). Except in the very old age (>9 years), these decreases have less impact on fecundity although the sexual motivation is highly reduced. Among reproductively active females, the oldest which produced young alive was 9 years old.

6.3. Hypothalamo–pituitary–thyroid axis and ageing

For age-related changes in the thyroid function of humans, contradictory data have been obtained. Levels of thyroid hormones and TSH (thyroid stimulating hormone) are reduced, increased or unchanged (Kunikate et al., 1992; Magri et al., 2002). In healthy old subjects and in centenarians, general features of the thyroid function are maintained suggesting that ageing does not clearly affect the thyroid function (Ferrari et al., 2008; Mazzoccoli et al., 2010). Likewise, daily variations of the thyroxin secretion marked by a peak in the late afternoon seem to be spared by ageing. In old mouse lemurs, morphological changes of the thyroid suggest a reduced secretion of thyroid hormones during the breeding season (Perret, 1975).

6.4. Hypothalamo–pituitary–adrenals axis and ageing

Within the corticoadrenal steroids, the cortisol secretion appears relatively unchanged with ageing in humans despite a tendency for an advanced morning peak and a flattened daily amplitude (Mazzoccoli et al., in press). On the contrary, dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) levels are significantly reduced during ageing in both sexes in primates including humans (Labrie et al., 1997; Morley et al., 1997; Beaulieu et al., 2000; Kemnitz et al., 2000; Tannenbaum et al., 2004) with the disappearance of the daily morning peak of secretion. The ratio cortisol/DHEA-S is considered as a relevant indicator of biological ageing in primates. The DHEA level could be a predictor of intra and inter-specific longevity (Labrie, 2010; Ohlsson et al., 2010; Muehlenbein et al., 2003). As in other primates, age-related changes in DHEA-S are characterized by a clear decline in old animals, but during the breeding season only. Longitudinal studies demonstrated that the earlier and faster is the decrease in DHEA-S, the shorter is the longevity (Perret and Aujard, 2005).

7. Age-associated alterations of the central nervous system

7.1. Cognitive functions and ageing

Human ageing is frequently accompanied by alterations of numerous aspects of behavior and cognition, namely intact procedural memory, progressive and widespread decline in executive functions with limited declarative memory dysfunction. In the case of age-associated pathologies such as Alzheimer's disease (Gabrieli, 1996) increased declarative memory dysfunction is also apparent. While age related cognitive decline is well described, the underlying mechanism remain poorly understood and available pre-clinical models provide low predictive capacity for the clinic. Due to their similarity in brain structure to humans, non-human primates are viewed as the most useful and valid models for understanding cognitive deficits and their neurobiological substrates in the elderly. Five general domains of cognitive function have been examined in young and aged mouse lemurs: recognition memory, stimulus reward associative learning, working memory, spatial navigation and set-shifting ability which indeed reflect changes similar to those present in human ageing.

7.1.1. Recognition memory tasks

The delayed non-matching to sample task requires the animal to retain information about trial-specific stimuli over variable delay intervals and the general rule of the non-matching (Ridley and Baker, 1991). In a spatial version of this recognition memory task, the mouse lemur learns to enter the "novel" corridor to reach the reinforcement. Aged mouse lemurs display no deficit in acquisition of the rule, but about 40% of them express deficit in retention when latency between sample and choice increases (Dhenain et al., 1998a). In a free object exploration task (Picq and Dhenain, 1998), old animals exhibit difficulties in memorizing new objects in a complex and changing environment. Moreover, aged mouse lemurs do not seem to detect changes in location of familiar objects, maybe because of a deficit in memorizing the spatial position of these objects.

7.1.2. Discrimination tasks (Stimulus-reward associative learning tasks)

Numerous versions of discrimination tasks were used to assess cognitive capacities in mouse lemurs with olfactory or

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

visual/spatial cues (Joly et al., 2006; Picq, 2007). The go/no-go successive discrimination task requires an animal to emit a simple motor response to one cue while inhibiting the response in the presence of another cue (e.g., enter the lit corridor, and not the non-lit corridor). No deficits are observed in aged mouse lemurs, showing that the cognitive processes underlying simple stimulus-reward associations are preserved during ageing (Joly et al., 2006; Picq, 2007).

A generalization task (Picq, 2007), given after a simple simultaneous visual discrimination task, showed that a subpopulation of aged mouse lemurs (about 45%) was disturbed when it had to apply a previously acquired rule in a new context requiring new motor responses. Thus, some old animals have difficulties to make flexible use of acquired memories. A spatial rule-guided discrimination task was also performed: in each trial, the mouse lemurs were confronted with access to one pair of corridors, each individual corridor belonging to several pairs so that it had as well often positive as negative valence over a session. The valence of a given corridor was determined by its spatial position with respect to the other (Picq, 2007). A subgroup of aged mouse lemurs (about 30%) had severely impaired performances in this task which required comparison between items (the two corridors of a pair) and flexibility (the response to a given stimulus can be inverted between trials) and not only expression of biases toward single items, as in simple discrimination tasks.

7.1.3. Working memory tasks

Old mouse lemurs had no difficulty learning and memorizing the stimulus-reward association rule (simple visual discrimination), whereas they displayed impaired performances when a delay was imposed between the stimulus presentation and the response (Picq, 1995). That suggested severe age-related alteration of working memory in the mouse lemur. Working memory was also evaluated in the three-panel runway task: animals had to pass through a series of gated panels, with two of the three gates locked and to memorize the sequence of the open gates that remained constant over a session but changed daily (Trouche et al., 2010). Adults displayed a higher level of perseverative errors compared with aged animals. This behavior is likely due to the high level of anxiety exhibited by younger animals when placed in a novel environment (Picq, 1993a; Némoz-Bertholet and Aujard, 2003). Conversely, aged lemurs showed a rapid habituation to this three-panel runway task but made more working (and reference) memory errors compared to young ones that improved quickly their performance.

7.1.4. Spatial navigation task

Reference and working spatial memories were assessed in mouse lemurs in circular platform task and in radial maze task adapted to this species. The circular platform task is useful to evaluate the reference memory. The animal must use allocentric cues to reach the reinforcement, positioned under one randomly chosen hole among the 12 (Picq et al., in press). A large individual variability was observed: some of the older animals performing as well as younger ones whereas some other aged subjects were severely impaired. Thus a subset of aged mouse lemurs (about 60%) exhibited allocentric spatial memory impairments. In the eight-arm radial maze task, four of eight arms give a reinforcement (Picq, 1993b). Both aged and young groups memorized the position of the blind arms with an equal efficiency. However, the aged group displayed impaired performance for visiting alternatively the reinforced arms without repetition. That corroborates the theory that age would deteriorate working memory, but not reference memory.

7.1.5. Set-shifting task

Executive functions were evaluated by testing the effects of intra- and extra-dimensional shifts on visual/spatial discrimination (Picq, 2007; Picq et al., in press). After a visual discrimination task, mouse lemurs had to perform a reversal task during which the reward contingencies were reversed; the dark corridor being now associated with the reward. Then mouse lemurs were tested in a task of shift of the discriminating stimulus (extra-dimensional shift). The positive stimulus became the right corridor, regardless of luminosity, thus requiring a shift of attentional set from visual characteristics to spatial location. Finally, animals were required to do a task of reversion of the spatial discrimination: a response to the corridor on the left was now correct and correlated with the rewarding. Performances at visual discrimination were independent of age, but on extra- and intra-dimensional shifts tasks, older mouse lemurs were significantly impaired. All the aged mouse lemurs were impaired in set-shifting tasks with no overlap between younger and old group scores (Picq, 2007; Picq et al., in press). This difficulty in reversing or shifting previous discriminations indicates a widespread age-related cognitive rigidity, widely described in both human and animal studies (Dempster, 1992; Barense et al., 2002; Moore et al., 2003). However aged animals differed in their pattern errors: some had difficulties in disengaging from the previous rule whereas some others displayed difficulties in maintaining the new rule. Results of reversion of visual/spatial discrimination are consistent with those found for reversion of olfactory discrimination which brought out a subgroup of aged mouse lemurs with strong cognitive impairment (Joly et al., 2006).

The findings in the mouse lemur enforce the idea of a selective vulnerability of cognitive functions to ageing and, consequently, of a selective vulnerability of the neural systems subserving these cognitive functions. Thus, the following pattern of cognitive ageing in mouse lemurs can be established: (1) The ability to form simple stimulus-reward associations, as required on tasks of simultaneous or concurrent discriminations, is preserved. To the extent that such tasks encourage implicit acquisition of habit through repetition of the learning events, they involve procedural memory. Thus, procedural memory appears to be spared during ageing in mouse lemurs. (2) Working memory and ability to rapidly shift strategy when previous strategies become irrelevant are severely impaired in most aged mouse lemurs as demonstrated by radial maze, delayed response and set-shifting tasks. These cognitive capacities are part of executive functions. Consequently, executive functions are especially vulnerable to ageing in mouse lemurs. (3) Reference spatial memory, spatial and object recognition memory and capacity to use flexibly acquired information (generalization and spatial rule-guided discrimination tasks) are impaired in a subset of aged mouse lemurs. It can be argued that these cognitive abilities characterize declarative memory. Indeed, according to several authors (Sherry and Schacter, 1987; Squire, 1992; Eichenbaum, 1999), declarative memory refers to a memory system fundamentally designed to recollect specific events and which, consequently, possesses several key-features: (i) ability to form conjunctions between arbitrary items (because a unique event is a conjunction of arbitrary items); any task requiring comparison of items (such as the spatial rule guided discrimination test) or relational representation of items (such as circular platform test) taps into that ability; (ii) capacity to store rapidly information specific to a single episode as required on recognition tasks; and (iii) ability to use acquired information with flexibility as on delayed non-matching to sample, spatial rule-guided discrimination or generalization tasks. Thus, declarative memory seems to be impaired in a subpopulation of aged mouse lemurs.

These behavioral studies show that mouse lemurs mimic the pattern of cognitive ageing described in humans, namely intact procedural memory, progressive and widespread decline in executive functions, limited declarative memory dysfunction except in case of age-associated pathologies such as Alzheimer's disease (Gabrieli, 1996). Not all the aged mouse lemurs are equally

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

affected by behavioral and cognitive ageing. Some are profoundly impaired while others perform as well as younger animals. That increasing individual variability accompanying ageing is consistently reported in animal and human studies (Valdois et al., 1990; Bachevalier et al., 1991; Rapp and Amaral, 1992; Ylikoski et al., 1999). It provides the opportunity to identify biological, physiological and neural correlates of successful versus impaired cognitive ageing. It also offers the possibility to distinguish between normal and pathological ageing.

7.2. Cerebral morphological alterations and ageing

In humans, cerebral atrophy is one of the most described cerebral alterations that occurs during normal and pathological ageing. During normal ageing, cerebral atrophy occurs mainly in frontal regions of the brain (Raz et al., 2005; Kalpouzos et al., 2009) as well as in the caudate (Raz et al., 2005). An alteration of white matter is also described in some studies (Resnick et al., 2003; but see Good et al., 2001). White matter alterations have been related to hypertensive alterations (Benisty et al., 2009). During pathological ageing, such as during Alzheimer's disease, changes are first detected in the hippocampus and cingulate cortex (Chetelat et al., 2002).

In mouse lemurs, histological studies have shown that some aged animals present atrophy of brain areas such as the white and grey matter of the cortex, the hippocampus, the basal ganglia, the brainstem and sometimes the cerebellum (Bons et al., 1992). The most marked atrophy being observed in the cortex, which is accompanied by a significant enlargement of the lateral ventricles compared to young animals where the cavities are limited (Bons et al., 1992).

In mouse lemurs, as in humans, magnetic resonance imaging (MRI) has been used to evaluate age-associated cerebral atrophy (Dhenain et al., 1997, 2000). An atrophy process starts between 5 and 8 years of age in some animals and it evolves rapidly once initiated (Dhenain et al., 2000). Atrophy thus appears to be an age-related pathological condition and not an inevitable effect of age. Brain atrophy in lemurs leads to accumulation of cerebrospinal fluid first in the frontal pericortical areas, then in parietal and temporal pericortical regions and finally in all the pericortical regions (Dhenain et al., 2003; Kraska et al., 2011). These patterns are consistent with a progression of the atrophy starting from sharply demarcated regions toward a more generalized process encompassing the whole brain. A more recent study evaluated the precise location of atrophied tissues. It reveals a severe atrophy in the caudate and white matter of all the aged animals (Picq et al., in press). Because atrophy of these regions occurs in all old animals and is well correlated with age, it is considered as part of the "normal" ageing process in lemurs. A cortical atrophy was also detected in the cingulate, occipital, and temporal (including entorhinal) cortices. On the other hand, in some regions, namely the hippocampus and the septum, the atrophy involves only a subcategory of animals, which suggests that it is related to pathological ageing. Even more interesting, in aged mouse lemurs, cognitive performances (in spatial reference memory and executive tasks) are correlated to atrophy levels in the hippocampus, entorhinal, and septum (Picq et al., in press). To our knowledge, such a relationship between alterations of a given cognitive function and macroscopic atrophy of specific cerebral regions has never been described in other non-human primates. This reinforces the values of biomarkers based on atrophy as indicators of functional alterations. The tissue lesions underlying atrophy processes in lemurs have been poorly evaluated so far. One study has however suggested a link between brain atrophy and intracellular amyloid depositions as well as astrogliosis (Kraska et al., 2011).

On the basis of cerebral atrophy, one can classify animals as having a physiological or pathological ageing. Biomarkers based on MRI can thus be used to select animals and further evaluate histological alterations associated to pathological ageing and treatments against age-related neuropathologies.

7.3. Neuropathological alterations and ageing

Brains from animals with cortical atrophy show striking signs of degenerating structures: neuritic debris including argyrophilic rings of degenerated axon terminals, pyramidal neurons with argyrophilic filaments in the perikarya and apical dendrite, and lesions characterized by clusters of argyrophilic neurites associated with dystrophic glial cells and surrounding an amyloid core (Bons et al., 1992). Immunohistochemical study confirms that β amyloid peptide (Aβ) and its precursor (Amyloid Precursor Protein, APP) are present in vascular and extracellular deposits (Bons et al., 1994; Silhol et al., 1996). Leptomeningeal and cortical vascular deposits are observed in 30% of old mouse lemurs (Mestre-Francés et al., 1996). For parenchymal deposits, different types are evidenced according the maturation: pre-amyloid stage detected only by silver impregnation, diffuse Aβ immunoreactive deposits and focal deposits characterized by a dense core of amyloid surrounded by a diffuse halo of amyloid. Most of the diffuse plaques are strongly positive for Aβ42 whereas only a subset of deposits are positive for Aβ40, particularly in the amygdalar nuclei (Mestre-Francés et al., 2000). Aβ42 in mouse lemurs is associated with early stages of plaque maturation as also shown in humans (Iwatsubo et al., 1994). Plaques are generally distributed first into the neocortex and finally in the hippocampus of some animals. In young lemurs, astrocytes are observed only in cortical white matter (corpus callosum). In old lemurs, some reactive astrocytes characterized by a thickening of filaments into the perikarya and astrocytic processes are detected in some cortical areas. When old lemurs present amyloid plaques, the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) is two fold increased compared to old animals (Bons et al., 2000).

Delacourte et al. (1995) previously showed in several old animals an increase in the molecular weight of Tau proteins (microtubule-associated protein). This increase is due to a change of conformation and a stabilization in the hyperphosphorylated state. This change was also investigated by immunohistochemistry with an antibody labeling both normal and abnormally phosphorylated Tau. In cortical pyramidal neurons, Tau protein is aggregated and localized close to the cytoplasmic membrane of the cell bodies and neurites instead of a regular cytoplasmic distribution (Bons et al., 1995). The prevalence and the density of Tau protein-immunoreactive accumulations in the neocortex increases steadily with age (Giannakopoulos et al., 1997). Neurons of neocortical areas are frequently Tau-immunoreactive even in young animals whereas the subiculum and entorhinal cortex are Tau-positive only in animals older than 8 years. No correlation is observed between Aβ deposits and Tau-protein accumulation in the neocortex.

The population of old mouse lemurs can be classified into 4 groups: animals presenting amyloid plaques without (5–10%) or with a tauopathy (1%), animals presenting tauopathy in the absence of amyloid plaques (1%), and animals without any lesion (90%). These data suggest that most of the mouse lemurs undergo a normal ageing, whereas some others show age-associated pathologies.

7.4. Iron accumulation and ageing

In humans, during normal ageing, a strong iron accumulation is described in the globus pallidus, the substantia nigra, the red nucleus, the putamen, the caudate nucleus, the dentate nucleus as well as the subthalamic body (Hallgren and Sourander, 1958). Because of its good sensitivity to iron, MRI was used to detect iron

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

in mouse lemurs. As in humans, a strong accumulation of iron was found in the globus pallidus, the substantia nigra, and the thalamus in old lemurs. Other structures such as the neocortical and cerebellar white matter, anterior forebrain structures, including the nucleus basalis of Meynert were also shown to accumulate iron while the animals aged (Dhenain et al., 1998b; Gilissen et al., 1999). An interesting point is the overlap of the iron accumulation with the distribution of cholineacetyltransferase-immunoreactive neurons (Gilissen et al., 1999), which are precisely some of the neurons that are involved in age-associated pathologies in lemurs but also in humans.

7.5. Synaptic function and ageing

Functional imaging studies of the ageing human brain have revealed that different brain regions that interact to subserve higher-order cognitive functions show less coordinated activation with ageing, suggesting a global loss of integrative function (Andrews-Hanna et al., 2007). Changes in the synaptic physiology of ageing neurons may contribute to altered connectivity and higher order integration.

Acetylcholine is widely distributed in the nervous system and it plays a significant role in developing cerebral cortex in a number of mammalian species (Hohmann and Berger-Sweeney, 1998). A substantial number of studies suggest that it helps in establishing synaptic contacts in networks of cells in developing brain that will subserve complex cognitive functions in adulthood (Berger-Sweeney and Hohmann, 1997; Berger-Sweeney, 1998). With ageing, these complex networks of cholinergic system have been described to undergo moderate neurodegenerative changes resulting in age-related memory deficits (Bigl et al., 1990; Härtig et al., 2002). Changes in the cholinergic system during ageing have been determined by assessing the acetylcholine synthesizing and degrading enzyme, cholineacetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase. The first semiquantitive measurement of forebrain ChAT-containing neuron in mouse lemurs ranging from 3 months to 12 years of age demonstrated variable cholinergic alterations without any direct correlation with age (Mestre and Bons, 1993). A year later, Dournaud et al. (1994) reported an age-related increase in ChAT activity in the cortex of middle-aged to aged mouse lemurs. Their exclusion of a young age group was influenced by a study performed by Wenk et al. (1989) on 23 rhesus monkeys that demonstrated a cortical age-associated decline in ChAT activity in the frontal cortex but a relative increase between middle-aged and aged monkeys. Also, another study in lemurs reported that the atrophy of basal ganglia compromises functionality of the forebrain cholinergic system (Mestre and Bons, 1993). A neuronal loss of cholinergic neurons is detected in some aged mouse lemurs. This loss reaches 40% into the accumbens nucleus, 70% into the caudate nucleus and 80% into the globus pallidus. It is also accompanied by an alteration of the cytology of the remaining cholinergic neurons: neuritic processes are shortened, devoid of ramifications, and the cytoplasm of the perikarya is characterized by the presence of large vacuoles. By contrast, adult animals show numerous cholinergic neurons with large and ramified neuritic processes (Mestre and Bons, 1993).

The cholinergic system is not the only neurotransmitter system that is modified along with ageing: the serotoninergic system also shows a loss of neurons reaching 76% in the medial raphe and 63% in the raphe pallidus. A neuronal loss reaching 63% is also detected in the reticular formation (Jallageas et al., 1998) whereas the cortical level of somatostatin remains unchanged with ageing (Dournaud et al., 1994).

Endocannabinoid signaling is another critical system for brain function. It plays an important role in synaptic function by presynaptic CB_1 receptors on neurons and modulates neurotransmitter release from axon terminals (Lutz, 2004). A study performed by Harkany et al. (2005) identified the distribution of receptors in the forebrain of mouse lemurs with particular reference to CB1 receptor distribution in basal forebrain cholinergic areas and their output pathways. They did not find any age-related differences in CB_1 receptors distribution patterns based on the analysis of the neocortex, hippocampus and cholinergic basal forebrain nuclei.

7.6. Transcriptomic approaches

Furthermore, these observations have been recently corroborated by transcriptomic data of the temporal cortex of *M. murinus* using human DNA chips (Abdel Rassoul et al., 2010). This was made possible by the fact that numerous genes had shown between 90% and 100% of identity with their human counterparts as it was previously observed for APP (100%, Silhol et al., 1996), presenilin 1 (95.3%, Calenda et al., 1996), presenilin 2 (95.6%, Calenda et al., 1998) or ApoE4 allele (92.7%, Calenda et al., 1995). Gene expression profiles were assessed in the temporal cortex of young adults, healthy old animals and "Alzheimer's Disease-like" ("AD-like") animals that presented β-amyloid plaques and cortical atrophy. The temporal cortex was chosen because this region is connected to the hippocampus and to the frontal cortex, two critical structures for learning and memory which are altered in Alzheimer's disease. By SAM (significance analysis of microarrays), Abdel Rassoul et al. identified 47 genes that discriminated young from healthy old and "AD-like" animals. In addition, ANOVA of the expression data from the three groups identified 695 genes (including the 47 genes) with significant changes of expression in old and "AD-like" in comparison to young animals. Very interestingly, hierarchical clustering analysis indicates that each group has distinct and characteristic expression profiles. Functional categorization shows that most of the genes that were up-regulated in healthy old and down-regulated in "AD-like" animals belong to metabolic pathways, particularly protein synthesis. These data suggest the existence of compensatory mechanisms during physiological brain ageing that disappear in "AD-like" animals (Abdel Rassoul et al., 2010).

8. Conclusion

In summary, longitudinal assessment of endocrinology and cognitive performance has demonstrated that mouse lemurs display many features in common with human ageing (Table 1). Together this data suggests that the mouse lemur may provide an ideal system in which to:

(i) Understand the mechanisms and the dynamic evolution of healthy and pathological ageing. Numerous investigations in mouse lemurs highlight the biological manifestations of ageing in various research fields (e.g., endocrinology, neurosciences) by comparing aged animals to adults. Some physiological and behavioral modifications seem to appear in the same age range and evolve in parallel with healthy ageing (e.g., IFN-γ level and fragmentation of the activity rhythms (Cayetanot et al., 2009)) and pathological ageing (e.g., cognitive performance and cerebral atrophy (Picq et al., in press)). In mouse lemurs, longitudinal studies will be useful to determine the evolution of each criterion of ageing.
(ii) Offer predictive biomarkers of longevity and neuropathological ageing. To date, DHEA-S (Perret and Aujard, 2005), IGF-1 (Aujard et al., 2010) and IFN-γ levels (Cayetanot et al., 2009) have shown properties to be validated as good predictors of longevity in mouse lemurs.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

Table 1
Age-related changes in mouse lemurs.

Age-related changes	Mouse lemur			Human references
	References	Age criteria (years): Adult versus old		
Seasonal rhythms				
↓amplitude of seasonal variations of body mass, resting metabolic rate, sex hormones and behavioral thermoregulation	Perret and Aujard (2006) Terrien et al. (2011)	1 –4 1–4	6–11 6–11	
Daily rhythms				
↑Fragmentation of rest-activity rhythm	Aujard et al. (2006a, 2006b)	1–4	5–8	Van Someren and Riemersma-VanDerLek (2007)
↓Activity amplitude	Aujard et al. (2006a, 2006b) Aujard et al. (2007)	1–4 2.5 ± 0.5	5–8 7.3 ± 0.8	
↓Free-running period	Cayetanot et al. (2005a, 2005b) Aujard et al. (2007)	2.2 ± 0.2 2.5 ± 0.5	6.3 ± 0.5 7.3 ± 0.8	
↓Nocturnal peak of melatonin	Aujard et al. (2001)	2.4 ± 0.2	7.3 ± 1.3	Waldhauser et al. (1998)
Modification of cellular function in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus	Aujard et al. (2001) Cayetanot et al. (2005a, 2005b, 2007)	2.4 ± 0.2 2.2 ± 0.2	7.3 ± 1.3 6.2 ± 0.2	
Thermo-regulation				
↓Body temperature and increasing of torpor frequency during cold challenge	Terrien et al. (2008) Terrien et al. (2009b)	2.3 ± 0.3	7.1 ± 0.2	
Modification of behavioral thermoregulation	Terrien et al. (2011)	1–4	6–11	
Physiological parameters				
↓IGF-1 level	Aujard et al. (2010)	0.5–11		Morley et al. (1997)
↓Testosterone and oestrogen levels	Perret (1997, 2005)	1–3	6–11	
IDHEA-S level	Perret and Aujard (2005)	1–3	6–11	
↓IFN-y (cytokine) level	Cayetanot et al. (2009)	4–7.8		Nikolich-Zugich (2005)
Behaviors				
↓Sexual and aggressive behaviors	Aujard and Perret (1998)	3.2 ± 0.4	8.4 ± 0.7	Staudinger (2005)
↓Social interaction	Picq (1992)	1–3	9–12	
↓Anxiety	Picq (1993a) Némoz-Bertholet and Aujard (2003)	1–3 2.9 ± 0.5	8–12 8.0 ± 0.8	
Sensori-motor functions				
↓Motor coordination and balance	Némoz-Bertholet and Aujard (2003)	2.9 ± 0.5	8.0 ± 0.8	Kenny (2005)
↓Odor perception	Némoz-Bertholet et al. (2004) Cayetanot et al. (2005a, 2005b)	2.2 ± 0.2 2.2 ± 0.2	6.3 ± 0.4 6.3 ± 0.4	Margrain and Boulton (2005)
Ocular pathology: Cataract	Beltran et al. (2007)	1–4	7–11	
Cognition				
No deficit of simple associative memory	Joly et al. (2006) Picq (2007)	3–4 2–4	6–14 7–11	
↓Working memory	Picq (1993b) Picq (1995) Trouche et al. (2010)	1–4 2–4 2–3	9–10 9–10 6–12	Grady and Craik (2000)
↓Executive function	Joly et al. (2006) Picq (2007) Picq et al. (in press)	3–4 2–4 2.4 ± 0.4	6–14 7–11 8.0 ± 1.4	
Cognitive pathology: ↓declarative memory (spatial/object recognition, behavioral flexibility, spatial reference memory)	Dhenain et al. (1998a, 1998b) Picq and Dhenain, 1998 Picq (2007) Picq et al. (in press)	1–4 1–4 2–4 2.4 ± 0.4	7–10 8–9 7–11 8.0 ± 1.4	Gabrieli (1996)
Brain				
Cerebral atrophy in the caudate and the white matter	Picq et al. (in press)	2.4 ± 0.4	8.0 ± 1.4	Raz et al. (2005)
↑ChAT activity	Dournaud et al. (1994)	5–8	10–11	Gottfries (1990)
Iron accumulation	Dhenain et al. (1998b)	0.5–2.0	7–9	Hallgren and Sourander (1958)
Brain pathology: Abrupt and localized atrophy in the hippocampus, septum, and cortex (temporal, occipital, cingulate)	Bons et al. (1992) Dhenain et al. (2000) Kraska et al. (2011) Picq et al. (in press)	2–3 1.0–2.5 1.9–2.5 2.4 ± 0.4	8–11 3.5–10.3 6.4–11.3 8.0 ± 1.4	Chetelat et al. (2002)
Amyloid deposits	Bons et al. (1994) Silhol et al., 1996 Mestre-Francés et al. (1996, 2000)	2 1–5 2–4	8–13 8–11 8–13	Castellani et al. (2010)
Gliosis	Kraska et al. (2011)	1.9–2.5	6.4–11.3	
Structural modification and aggregation of Tau proteins	Delacourte et al. (1995) Bons et al., 1995 Giannakopoulos et al., 1997	2 2 1–4	6–9 7–10 8–13	
Loss of cholinergic neurons	Mestre and Bons (1993) Jallageas et al. (1998)	1 2–5	7–10 8–13	Whitehouse et al. (1982)

(iii) Bring new insights into the biology of ageing and to offer potential targets for therapeutic interventions.

In the mouse lemur, age-related physiological changes resemble those observed in humans: hormonal deregulations (DHEA-S, IGF-1, testosterone, oestrogen), modifications of biological rhythms (fragmentation, desynchronization), alteration of thermoregulation, decrease in sensorimotor and cognitive capacities, structural and functional modifications of brain. Given these recent advances in the understanding of the age-related changes in this primate (Table 1) and given the recent development of the knowledge of its genome, the mouse lemur is a useful model of human ageing.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

Acknowledgements

FA, OB, IH, EAI, SL, FP, AR, ES are funded as part of the PharmaCog consortium by the European Community's Seventh Framework Programme for the Innovative Medicine Initiative under Grant Agreement no. 115009. For further information please refer to www.pharmacog.org. SB, ADP, JE, JM, MP, JLP, JT are funded by the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research. MD, MP, NMF and JMV are founded by the French National Foundation for Alzheimer's Disease and Related Disorders. GD and JMV are funded by the Region Languedoc-Roussillon (FUI DIATRAL project). Gratitude is extended to all the investigators and technicians involved in these researches on mouse lemurs. We thank Eric Gueton for the mouse lemur pictures.

References

Abdel Rassoul, R., Alves, S., Pantesco, V., De Vos, J., Michel, B., Perret, M., Mestre-Francés, N., Verdier, J.M., Devau, G., 2010. Distinct transcriptome expression of the temporal cortex of the primate *Microcebus murinus* during brain aging versus Alzheimer's disease-like pathology. PLoS One 5, e12770.

Aguiar-Oliveira, M.H., Oliveira, F.T., Pereira, R.M., Oliveira, C.R., Blackford, A., Valenca, E.H., Santos, E.G., Gois-Junior, M.B., Meneguz-Moreno, R.A., Araujo, V.P., Oliveira-Neto, L.A., Almeida, R.P., Santos, M.A., Farias, N.T., Silveira, D.C., Cabral, G.W., Calazans, F.R., Seabra, J.D., Lopes, T.F., Rodrigues, E.O., Porto, L.A., Oliveira, I.P., Melo, E.V., Martari, M., Salvatori, R., 2010. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 714–721.

Andrews-Hanna, J.R., Snyder, A.Z., Vincent, J.L., Lustig, C., Head, D., Raichle, M.E., Buckner, R.L., 2007. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. Neuron 56, 924–935.

Antle, M.C., Silver, R., 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. Trends Neurosci. 28, 145–151.

Araujo, A., 2003. Male behavioral response to the urine odor of females in lesser mouse lemur (*Microcebus murinus* Miller, 1777, Cheirogaleidae, Primates). Revista Brasileira de Zoociências 5, 55–77.

Aujard, F., 1997. Effect of vomeronasal organ removal on male socio-sexual responses to female in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). Physiol. Behav. 62, 1003–1008.

Aujard, F., Perret, M., 1998. Age-related effects on reproductive function and sexual competition in the male prosimian primate, *Microcebus murinus*. Physiol. Behav. 64, 513–519.

Aujard, F., Dkhissi-Benyahya, O., Fournier, I., Claustrat, B., Schilling, A., Cooper, H.M., Perret, M., 2001. Artificially accelerated aging by shortened photoperiod alters early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatonin excretion in a small primate, *Microcebus murinus*. Neuroscience 105, 403–412.

Aujard, F., Némoz-Bertholet, F., 2004. Response to urinary volatiles and chemosensory function decline with age in a prosimian primate. Physiol. Behav. 81, 639–644.

Aujard, F., Cayetanot, F., Bentivoglio, M., Perret, M., 2006a. Age-related effects on the biological clock and its behavioral output in a primate. Chronobiol. Int. 23, 451–460.

Aujard, F., Seguy, M., Terrien, J., Botalla, R., Blanc, S., Perret, M., 2006b. Behavioral thermoregulation in a non human primate: effects of age and photoperiod on temperature selection. Exp. Gerontol. 41, 784–792.

Aujard, F., Cayetanot, F., Terrien, J., Van Someren, E.J.W., 2007. Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate. Exp. Gerontol. 42, 1079–1087.

Aujard, F., Bluet-Pajot, M.T., Zizzari, P., Perret, M., Epelbaum, J., 2010. IGF-1: a marker of individual life-span in a primate. Ageing Res. 2, e1.

Bachevalier, J., Landis, L.S., Walker, L.C., Brickson, M., Mishkin, M., Price, D.L., Cork, L.C., 1991. Aged monkeys exhibit behavioral deficits indicative of widespread cerebral dysfunction. Neurobiol. Aging 12, 99–111.

Balasko, M., Petervari, E., Koncsecsko-Gaspar, M., Szekely, M., 2006. Cold-adaptation: Neuropeptide Y versus thermal signals in the development of hyperphagia. In: 2nd International Meeting on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulationed, Phoenix, AZ: Pergamon-Elsevier Science Ltd, pp. 115–123.

Barense, M.D., Fox, M.T., Baxter, M.G., 2002. Aged rats are impaired on an attentional set-shifting task sensitive to medial frontal cortex damage in young rats. Learn. Mem. 9, 191–201.

Barzilai, N., Gabrieli, I., 2010. Genetic studies reveal the role of the endocrine and metabolic system in aging. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 4493–4500.

Beaulieu, E.-E., Thomas, G., Legrain, S., Lalhou, N., Roger, M., Debuire, B., Faucounau, V., Girard, L., Hervy, M.-P., 2000. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate and aging: contribution of the DHEA age study to a sociobiomedical issue. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 4279–4284.

Beltran, W.A., Vanore, M., Ollivet, F., Nemoz-Bertholet, F., Aujard, F., Clerc, B., Chahory, S., 2007. Ocular findings in two colonies of gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*). Vet. Ophthalmol. 10, 43–49.

Benisty, S., Gouw, A.A., Porcher, R., Madureira, S., Hernandez, K., Poggesi, A., Van der Flier, W.M., Van Straaten, E.C.W., Verdelho, A., Ferro, J., Pantoni, L., Inzitari, D., Barkhof, F., Fazekas, F., Chabriat, H., 2009. Location of lacunar infarcts correlates with cognition in a sample of non-disabled subjects with age-related white-matter changes: the LADIS study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 80, 478–483.

Berger-Sweeney, J., 1998. The effects of neonatal basal forebrain lesions oncognition: towards understanding the developmental role of thecholinergic basal forebrain. Int. J. Dev. Neurosci. 16, 603–612.

Berger-Sweeney, J., Hohmann, C.F., 1997. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. Behav. Brain Res. 86, 121–142.

Bigl, V., Arendt, T., Biesold, D., 1990. The nucleus basalis of Meynert during aging and in dementing neuropsychiatric disorders. In: Steriade, M., Biesold, D. (Eds.), Brain Cholinergic Systems. Oxford University Press, Oxford, pp. 364–386.

Bons, N., Mestre, N., Petter, A., 1992. Seniles plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate *Microcebus murinus*. Neurobiol. Aging 13, 99–105.

Bons, N., Mestre, N., Ritchie, K., Petter, A., Podlisny, M., Selkoe, D., 1994. Identification of amyloid beta protein in the brain of the small short-lived lemurian primate *Microcebus murinus*. Neurobiol. Aging 15, 215–220.

Bons, N., Jallageas, V., Silhol, S., Mestre-Francés, N., Petter, A., Delacourte, A., 1995. Immunocytochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. C. R. Acad. Sci. 318, 77–83.

Bons, N., Keller, E., Mestre-Frances, N., Calenda, A., 2000. Modèle animal du vieillissement cérébral: recherche de critères de l'évolution de la santé cérébrale du primate *Microcebus murinus* avec l'âge. In: Attention la mémoir. Solal Eds, pp 77–94.

Brock, M.A., 1991. Chronobiology and aging. J. Am. Geriatr. 39, 74–91.

Calenda, A., Jallageas, V., Silhol, S., Bellis, M., Bons, N., 1995. Identification of a unique apolipoprotein E allele in *Microcebus murinus*; ApoE brain distribution and co-localization with beta-amyloid and tau proteins. Neurobiol. Dis. 2, 169–176.

Calenda, A., Mestre-Francés, N., Czech, C., Pradier, L., Petter, A., Bons, N., Bellis, M., 1996. Molecular cloning, sequencing and brain expression of the presenilin 1 gene in *Microcebus murinus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, 430–439.

Calenda, A., Mestre-Francés, N., Czech, C., Pradier, L., Petter, A., Perret, M., Bons, N., Bellis, M., 1998. Cloning of the presinilin 2 cDNA and its distribution in brain of the primate *Microcebus murinus*, coexpression with βAPP and Tau proteins. Neurobiol. Dis. 5, 323–333.

Canale, C.I., Perret, M., Théry, M., Henry, P.Y., 2011. Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate. J. Exp. Biol. 214, 551–560.

Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A., 2010. Alzheimer disease. Dis. Mon. 56, 484–546.

Cayetanot, F., Bentivoglio, M., Aujard, F., 2005a. Arginine-vasopressin and vasointestinal polypeptide rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the mouse lemur reveal aging-related alterations of circadian pacemaker neurons in a non-human primate. Eur. J. Neurosci. 22, 902–910.

Cayetanot, F., Némoz-Bertholet, F., Aujard, F., 2005b. Age effects on pheromone induced Fos expression in olfactory bulbs of a primate. Neuroreport 16, 1091–1095.

Cayetanot, F., Deprez, J., Aujard, F., 2007. Calbindin D-28 K protein cells in a primate suprachiasmatic nucleus: localization, daily rhythm and age-related changes. Eur. J. Neurosci. 26, 2025–2032.

Cayetanot, F., Nygard, M., Perret, M., Kristensson, K., Aujard, F., 2009. Plasma levels of interferon- correlate with age-related disturbances of circadian rhythms and survival in a non-human primate. Chronobiol. Int. 26, 1587–1601.

Chetelat, G., Desgranges, B., De La Sayette, V., Viader, F., Eustache, F., Baron, J.C., 2002. Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. Neuroreport 13, 1939–1943.

Davis, R.T., 1978. Old monkey behavior. Exp. Gerontol. 13, 237–250.

Delacourte, A., Sautière, P.E., Wattez, A., Mourton-Gilles, C., Petter, A., Bons, N., 1995. Biochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. C. R. Acad. Sci. 318, 85–89.

Dempster, F.N., 1992. The rise and fall of the inhibitory mechanism: toward a unified theory of cognitive development and aging. Dev. Rev. 12, 45–75.

Dhenain, M., Michot, J.L., Volk, A., Picq, J.L., Boller, F., 1997. T2-weighted MRI studies of mouse lemurs: a primate model of brain aging. Neurobiol. Aging 18, 517–521.

Dhenain, M., Michot, J.-L., Volk, A., Gauthier, C.-A., Boller, F., Picq, J.L., 1998a. Etude préliminaire du vieillissement cognitif des microcèbes murins dans une version spatiale du test de non appariement retardé (Preliminary study of cerebral aging in mouse lemurs by a spatial version of the delayed non matching to sample task). Primatologie 1, 309–331.

Dhenain, M., Duyckaerts, C., Michot, J.L., Volk, A., Picq, J.L., Boller, F., 1998b. Cerebral T2-weighted signal decrease during aging in the mouse lemur primate reflects iron accumulation. Neurobiol. Aging 19, 65–69.

Dhenain, M., Michot, J.L., Privat, N., Picq, J.L., Boller, F., Duyckaerts, C., Volk, A., 2000. MRI description of cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiol. Aging 21, 81–88.

Dhenain, M., Chenu, E., Hisley, C.K., Aujard, F., Volk, A., 2003. Regional atrophy in the brain of lissencephalic mouse lemur primates: measurement by automatic histogram-based segmentation of MR images. Mag. Reson. Med. 50, 984–992.

Dkhissi-Benyahya, O., Szel, A., Degrip, W.J., Cooper, H.M., 2001. Short and mid-wavelength cone distribution in a nocturnal strepsirrhine primate (*Microcebus murinus*). J. Comp. Neurol. 438, 490–504.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

Dournaud, P., Gautron, J.P., Pattou, E., Bons, N., Mestre, N., Petter, A., Kordon, C., Epelbaum, J., 1994. Choline acetyltransferase and somatostatin levels in aged *Microcebus murinus* brain. Neurobiol. Aging 15, 727–731.
Duchamp, C., Burton, K.A., Geloen, A., Dauncey, M.J., 1997. Transient upregulation of IGF-I gene expression in brown adipose tissue of cold-exposed rats. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 272, 453–460.
Eichenbaum, H., 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. Behav. Brain Res. 103, 123–133.
Epelbaum, J., 2009. Le vieillissement: rythmes biologiques et hormonaux. TEC&Doc Editions, Paris.
Ferrari, E., Cravello, L., Falvo, F., Barili, L., Solerte, S.B., Fioravanti, M., Magri, F., 2008. Neuroendocrine features in extreme longevity. Exp Gerontol. 43, 88–94.
Gabrieli, J.D., 1996. Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 13534–13540.
Genin, F., Nibbelink, M., Galand, M., Perret, M., Ambid, L., 2003. Brown fat and non-shivering thermogenesis in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, 811–818.
Giannakopoulos, P., Silhol, S., Jallageas, V., Mallet, J., Bons, N., Bouras, C., Delaère, P., 1997. Quantitative analysis of tau protein-immunoreactive accumulations and beta amyloid protein deposits in the cerebral cortex of the mouse lemur, *Microcebus murinus*. Acta Neuropathol. 94, 131–139.
Gilbert, C., McCafferty, D., Le Maho, Y., Martrette, J.-M., Giroud, S., Blanc, S., Ancel, A., 2010. One for all and all for one: the energetic benefits of huddling in endotherms. Biol. Rev. 85, 545–569.
Gilissen, E.P., Jacobs, R.E., Allman, J.M., 1999. Magnetic resonance microscopy of iron in the basal forebrain cholinergic structures of the aged mouse lemur. J. Neurol. Sci. 168, 21–27.
Giroud, S., Blanc, S., Aujard, F., Bertrand, F., Gilbert, C., Perret, M., 2008. Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 294, 1958–1967.
Giroud, S., Perret, M., Le Maho, Y., Momken, I., Gilbert, C., Blanc, S., 2009. Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the gray mouse lemur. J. Comp. Physiol. B 179, 99–111.
Giroud, S., Perret, M., Stein, P., Goudable, J., Aujard, F., Gilbert, C., Robin, J.P., Le Maho, Y., Zahariev, A., Blanc, S., Momken, I., 2010. The grey mouse lemur uses season-dependent fat or protein sparing strategies to face chronic food restriction. PLoS One 5, e8823.
Goncharova, N.D., Lapin, B.A., 2004. Age-related endocrine dysfunction in non-human primates. Ann. Acad. Sci. U.S.A. 1019, 321–325.
Gontier, G., Holzenberger, M., 2010. IGF and insulin signaling pathways in longevity. Biol. Aujourdhui 204, 243–250.
Good, C.D., Johnsrude, I.S., Ashburner, J., Henson, R.N., Friston, K.J., Frackowiak, R.S., 2001. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. Neuroimage 14, 21–36.
Gordon, C.J., 1985. Relationship between autonomic and behavioral thermoregulation in the mouse. Physiol. Behav. 34, 687–690.
Gordon, C.J., 1987. Relationship between preferred ambient-temperature and autonomic thermoregulatory function in rat. Am. J. Physiol. 252, 1130–1137.
Gordon, C.J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. Physiol. Behav. 47, 963–991.
Gottfries, C.G., 1990. Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. J. Neurosci. Res. 27, 541–547.
Grady, C.L., Craik, F.I., 2000. Changes in memory processing with age. Curr. Opin. Neurobiol. 10, 224–231.
Guevara-Aguirre, J., Balasubramanian, P., Guevara-Aguirre, M., Wei, M., Madia, F., Cheng, C.W., Hwang, D., Martin-Montalvo, A., Saavedra, J., Ingles, S., de Cabo, R., Cohen, P., Longo, V.D., 2011. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. Sci. Transl. Med. 3, 70ra13.
Hallgren, B., Sourander, P., 1958. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. J. Neurochem. 3, 41–55.
Harkany, T., Dobszay, M.B., Cayetanot, F., Härtig, W., Siegemund, T., Aujard, F., Mackie, K.R., 2005. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors during evolution of cholinergic basal forebrain territories and their cortical projection areas: a comparison between the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) and rat. Neuroscience 135, 595–609.
Härtig, W., Bauer, A., Brauer, K., Gosche, J., Hortobagyi, T., Penke, P., Schliebs, R., Harkany, T., 2002. Functional recovery of cholinergic basal forebrain neurons under disease conditions: old problems, new solutions? Rev. Neurosci. 13, 95–165.
Heydecke, H., Schwibe, M., Kaumanns, W., 1986. Studies on social behaviour of aging rhesus monkeys (Macaca mulatta). Primate Rep. 15, 41–59.
Hohmann, C.F., Berger-Sweeney, J.E., 1998. Cholinergic regulation of cortical development: new twists on an old story. Perspect. Dev. Neurobiol. 5, 401–425.
Holleschau, A.M., Rathbun, W.B., 1994. The effects of age on glutathione-peroxidase and glutathione-reductase activities in lenses of old-world simians and prosimians. Curr. Eye Res. 13, 331–336.
Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y., 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). Neuron 13, 45–53.
Jallageas, V., Privat, N., Mestre-Francés, N., Silhol, S., Bons, N., 1998. Age-related changes in serotonergic and catecholaminergic brain systems in the lemurian primate *Microcebus murinus*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 839, 628–630.
Joly, M., Deputte, B., Verdier, J.M., 2006. Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, *Microcebus murinus*. Neurobiol. Aging 27, 1045–1049.
Kalpouzos, G., Chételat, G., Baron, J.C., Landeau, B., Mevel, K., Godeau, C., Barré, L., Constans, J.M., Viader, F., Eustache, F., Desgranges, B., 2009. Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. Neurobiol. Aging 30, 112–124.
Kenny, R.A., 2005. Mobility and falls. In: Johnson, M. (Ed.), The Cambridge Handbook of Age and Ageing. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 131–140.
Kenyon, C.J., 2010. The genetics of aging. Nature 464, 504–512.
Kemnitz, J.W., Roecker, E.B., Haffa, A.L., Pinheiro, J., Kurzman, I., Ramsey, J.J., MacEwen, E.G., 2000. Serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations accross the lifespan of laboratory-housed monkeys. J. Med. Primatol. 29, 330–337.
Kraska, A., Dorieux, O., Picq, J.L., Petit, F., Bourrin, E., Chenu, E., Volk, A., Perret, M., Hantraye, P., Mestre-Frances, N., Aujard, F., Dhenain, M., 2011. Age-associated cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiol. Aging 32, 894–906.
Kriegsfeld, L.J., Leak, R.K., Yackulic, C.B., LeSauter, J., Silver, R., 2004. Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis. J. Comp. Neurol. 468, 361–379.
Kunikate, J.M., Pekary, A.E., Hershman, J.M., 1992. Aging and the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. In: Endocrinology and Metabolism in the Elderly. Blackwell, Boston, MA, pp. 92–110.
Labrie, F., Belanger, A., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., 1997. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 2396–2402.
Labrie, F., 2010. DHEA, important source of steroid in men and even more in women. Prog. Brain Res. 182, 97–148.
Lata, H., Alia, L.W., 2007. Ageing: physiological aspects. JK Sci. 9, 111–115.
Lavery, W.L., 2000. How relevant are animal models to human ageing? J. R. Soc. Med. 93, 296–298.
Lutz, B., 2004. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. Biochem. Pharmacol. 68, 1691–1698.
Maggio, M., Cattabiani, C., Lauretani, F., Ferruci, L., Luci, M., Valenti, G., Ceda, G., 2010. The concept of multiple hormonal dysregulation. Acta Biomed. 81, 19–29.
Magri, F., Cravello, L., Fioravanti, M., Vignati, G., Albertelli, N., Bonacina, M., Ferrari, E., 2002. Thyroid function in old and very old healthy subjects. J. Endocrinol. Invest. 25, 60–63.
Margrain, T.H., Boulton, M., 2005. Sensory impairment. In: Johnson, M. (Ed.), The Cambridge Handbook of Age and Ageing. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 121–130.
Mazzoccoli, G., Pazienza, V., Piepoli, A., Muscarella, L.A., Inglese, M., De Cata, A., Giuliani, F., Tarquini, R., 2010. Hypothalamus-hypophysis-thyroid axis function in healthy aging. Biol. Regul. Homeost. Agents 24, 433–439.
Mazzoccoli, G., Vendemiale, G., Inglese, M., De Cata, A., Piepoli, A., Pazienza, V., Muscarella, L.A., Tarquini, R. Neuroendocrine axes function in healthy aging: Evaluation of predictive and manipulable blood serum indexes. Biomed Pharmacother. in press.
McEwen, B.S., 2002. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. Neurobiol. Aging 23, 921–939.
Mestre, N., Bons, N., 1993. Age-related cytological changes and neuronal loss in basal forebrain cholinergic neurons in *Microcebus murinus* (Lemurian, Primate). Neurodegeneration 2, 25–32.
Mestre-Francés, N., Silhol, S., Bons, N., 1996. Evolution of ß-amyloid deposits in the cerebral cortex of *Microcebus murinus* lemurian primate. Alzheimer's Res. 2, 19–28.
Mestre-Francés, N., Keller, E., Calenda, A., Barelli, H., Checler, F., Bons, N., 2000. Immunohistochemical analysis of cerebral cortical and vascular lesions in the primate *Microcebus murinus* reveal distinct Aβ42 and Aβ40 immunoreactivity profiles. Neurobiol. Dis. 7, 1–8.
Meydani, M., 2001. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 928, 226–235.
Moore, T.L., Killiany, R.J., Herndon, J.G., Rosene, D.L., Moss, M.B., 2003. Impairment in abstraction and set shifting in aged rhesus monkeys. Neurobiol. Aging 24, 125–134.
Morley, J., 1990. The role of Nutrition in the prevention of age associated diseases. In: Morley, J., Glick, Z., Rubenstein, L. (Eds.), Geriatric Nutrition: A comprehensive Review. Raven Press, New York, NY, pp. 89–103.
Morley, J.E., Kaiser, F., Raum, W.J., Perry, H.M., Flood, J.F., Jensen, J., Silver, A.J., Roberts, E., 1997. Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio insulin-like growth factor 1 to growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 7537–7542.
Muehlenbein, M.P., Campbell, B.C., Richard, R.J., Svec, F., Phillipppi-Flakenstein, K.M., Murchison, M.A., Myers, L., 2003. Dehydroepiandrosterone-sulfate as a biomarker of senescence in male non-human primates. Exp. Gerontol. 38, 1077–1085.
Némoz-Bertholet, F., Aujard, F., 2003. Physical activity and balance performance as a function of age in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). Exp. Gerontol. 38, 407–414.
Némoz-Bertholet, F., Menaker, M., Aujard, F., 2004. Are age-related deficits in balance performance mediated by time of day in a prosimian primate (*Microcebus murinus*)? Exp. Gerontol. 39, 841–848.
Nikolich-Zugich, J., 2005. T cell aging: naive but not young. J. Exp. Med. 201, 837–840.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

Ohdo, S., Koyanagi, S., Suyama, S., Hiquchi, S., Aramaki, H., 2001. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. Nat. Med. 7, 356–360.
Ohlsson, C., Labrie, F., Barret-Connor, E., Karlesson, K., Ljunggren, O., Vandenput, L., Mellström, D., Tivesten, A., 2010. Low serum levels of dehydroepiandrosterone sulfate predict all-cause and cardiovascular mortality in elderly Swedish men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 4406–4414.
Palomba, M., Bentivoglio, M., 2008. Chronic inflammation affects the photic response of the suprachiasmatic nucleus. J. Neuroimmunol. 193, 24–27.
Perret, M., 1975. Activité thyroïdienne de *Microcebus murinus*, influence de la captivité. Mammalia 39, 119–132.
Perret, M., 1997. Change in photoperiodic cycle affects life span in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). J. Biol. Rhythms 12, 136–145.
Perret, M., 2005. Relationship between urinary estrogen levels before conception and sex ratio at birth in a primate, the gray mouse lemur. Hum. Reprod. 20, 1504–1510.
Perret, M., Aujard, F., 2001. Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 281, 1925–1933.
Perret, M., Aujard, F., 2005. Aging and season affect plasma dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels in a primate. Exp. Gerontol. 40, 582–587.
Perret, M., Aujard, F., 2006. Aging and biological rhythms in primates. M S-Med. Sci. 22, 279–283.
Picq, J.L., 1992. Aging and social behaviour in captivity in *Microcebus murinus*. Folia Primatol. 59, 217–220.
Picq, J.L., 1993. Etude des aspects comportementaux du vieillissement chez un prosimien, Microcebus murinus. Doctoral Thesis, University of Paris.
Picq, J.L., 1993b. Radial maze performance in young and aged grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). Primates 24, 223–226.
Picq, J.L., 1995. Effects of aging upon recent memory in *Microcebus murinus*. Aging 7, 17–22.
Picq, J.L., 2007. Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. Exp. Gerontol. 42, 223–232.
Picq, J.L., Dhenain, M., 1998. reaction to new objects in young and aged grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). J. Exp. Psychol. 51, 337–348.
Picq, J.L., Aujard, F., Volk, A., Dhenain, M. Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. Neurobiol Aging. in press.
Rapp, P.R., Amaral, D.G., 1992. Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. Trends Neurosci. 15, 340–345.
Rathbun, W.B., Holleschau, A.M., 1992. The effects of age on glutathione synthesis enzymes in lenses of old-world simians and prosimians. Curr. Eye Res. 11, 601–607.
Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Head, D., Williamson, A., Dahle, C., Gerstorf, D., Acker, J.D., 2005. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. Cereb. Cortex 15, 1676–1689.
Resnick, S.M., Pham, D.L., Kraut, M.A., Zonderman, A.B., Davatzikos, C., 2003. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. J. Neurosci. 23, 3295–3301.
Ridley, R.M., Baker, H.F., 1991. A critical evaluation of monkey models of amnesia and dementia. Brain Res. Brain Res. Rev. 16, 15–37.
Ritz, P., 2001. Factors affecting energy and macronutrient requirements in elderly people. Public Health Nutr. 4, 561–568.
Sadki, A., Bentivoglio, M., Kristensson, K., Nygard, M., 2007. Suppressors, receptors and effects of biological clock. Neurobiol. Aging 28, 296–305.
Schilling, A., Perret, M., Predine, J., 1984. Sexual inhibition in a prosimian primate: a pheromone-like effect. J. Endocrinol. 102, 143–151.
Schilling, A., Perret, M., 1987. Chemical signals and reproductive capacity in a male prosimian primate (*Microcebus murinus*). Chem. Senses 12, 143–158.
Séguy, M., Perret, M., 2005. Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*). J. Comp. Physiol. B 175, 107–115.
Sherry, D.F., Schacter, D.L., 1987. The evolution of multiple memory systems. Psychol. Rev. 94, 439–454.
Silhol, S., Calenda, A., Jallageas, V., Mestre-Francés, N., Bellis, M., Bons, N., 1996. β amyloid protein precursor in *Microcebus murinus*: genotyping and brain localization. Neurobiol. Dis. 3, 169–182.
Smith, R.G., Betancourt, L., Sun, Y., 2005. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. Endocr. Rev. 26, 203–250.
Smith, T.D., Bhatnagar, K.P., Rossie, J.B., Docherty, B.A., Burrows, A.M., Cooper, G.M., Mooney, M.P., Siegel, M.I., 2007. Scaling of the first ethmoturbinal in nocturnal Strepsirrhines: olfactory and respiratory surfaces. Anat. Rec. 290, 215–237.
Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol. Rev. 99, 195–231.
Staudinger, U.M., 2005. Personality and ageing. In: Johnson, M. (Ed.), The Cambridge Handbook of Age and Ageing. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 237–244.
Stuart, J.A., Page, M.M., 2010. Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. Mech. Ageing Dev. 131, 591–598.
Tannenbaum, C., Barrett-Connor, E., Laughlin, G.A., Platt, R.W., 2004. A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernado Study. Eur. J. Endocrinol. 151, 717–725.
Taylor, N.A., Allsopp, N.K., Parkes, D.G., 1995. Preferred room temperature of young vs aged males: the influence of thermal sensation, thermal comfort, and affect. J. Gerontol. Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci. 50, 216–221.
Terrien, J., Zizzari, P., Bluet-Pajot, M.T., Henry, P.Y., Perret, M., Epelbaum, J., Aujard, F., 2008. Effects of age on thermoregulatory responses during cold exposure in a nonhuman primate, *Microcebus murinus*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, 696–703.
Terrien, J., Zizzari, P., Epelbaum, J., Perret, M., Aujard, F., 2009a. Daily rhythms of core temperature and locomotor activity indicate different adaptive strategies to cold exposure in adult and aged mouse lemurs acclimated to a summer-like photoperiod. Chronobiol. Int. 26, 838–853.
Terrien, J., Zahariev, A., Blanc, S., Aujard, F., 2009b. Impaired control of body cooling during heterothermia represents the major energetic constraint in an aging nonhuman primate exposed to cold. PLoS One 4, e7587.
Terrien, J., Ambid, L., Nibbelink, M., Saint-Charles, A., Aujard, F., 2010a. Non-shivering thermogenesis activation and maintenance in the aging gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). Exp. Gerontol. 45, 442–448.
Terrien, J., Perret, M., Aujard, F., 2010b. Gender markedly modulates behavioral thermoregulation in a non-human primate species, the mouse lemur (*Microcebus murinus*). Physiol. Behav. 101, 469–473.
Terrien, J., Perret, M., Aujard, F., 2011. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. Front Biosci. 16, 1428–1444.
Trouche, S.G., Maurice, T., Rouland, S., Verdier, J.M., Mestre-Frances, N., 2010. The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances. Neurobiol. Learn. Mem. 94, 100–106.
Valdois, S., Joanette, Y., Poissant, A., Ska, B., Dehaut, F., 1990. Heterogeneity in the cognitive profile of normal elderly. J. Clin. Exp. Neuropsychol. 12, 587–596.
Van Someren, E.J., Riemersma-VanDerLek, R.F., 2007. Live to the rhythm, slave to the rhythm. Sleep Med. Rev. 11, 465–484.
Waldhauser, F., Kovács, J., Reiter, E., 1998. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. Exp. Gerontol. 33, 759–772.
Wenk, G.L., Pierce, D.J., Struble, R.G., Price, D., Cork, C.L., 1989. Age-related changes in multiple neurotransmitter systems in the monkey brain. Neurobiol. Aging 10, 11–19.
Whitehouse, P., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R.J., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science 215, 1237–1239.
Yamashita, H., Kizaki, T., Ookawara, T., Sato, Y., Yamamoto, M., Ohira, Y., Ohno, H., 1994. Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? Life Sci. 55, 141–148.
Ylikoski, R., Ylikoski, A., Keskivaara, P., Tilvis, R., Sulkava, R., Erkinjuntti, T., 1999. Heterogeneity of cognitive profiles in aging: successful aging, normal aging, and individuals at risk for cognitive decline. Eur. J. Neurol. 6, 645–652.

Please cite this article in press as: Languille, S., et al., The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. Ageing Res. Rev. (2011), doi:10.1016/j.arr.2011.07.001

AGE (2011) 33:15–31
DOI 10.1007/s11357-010-9156-6

Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*

Alexandre Dal-Pan · Jérémy Terrien · Fabien Pifferi · Roger Botalla · Isabelle Hardy · Julia Marchal · Alexandre Zahariev · Isabelle Chery · Philippe Zizzari · Martine Perret · Jean Luc Picq · Jacques Epelbaum · Stéphane Blanc · Fabienne Aujard

Received: 27 January 2010 / Accepted: 19 May 2010 / Published online: 9 June 2010
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract A life-long follow-up of physiological and behavioural functions was initiated in 38-month-old mouse lemurs (*Microcebus murinus*) to test whether caloric restriction (CR) or a potential mimetic compound, resveratrol (RSV), can delay the ageing process and the onset of age-related diseases. Based on their potential survival of 12 years, mouse lemurs were assigned to three different groups: a control (CTL) group fed *ad libitum*, a CR group fed 70% of the CTL caloric intake and a RSV group (200 mg/kg.day^{-1}) fed *ad libitum*. Since this prosimian primate exhibits a marked annual rhythm in body mass gain during winter, animals were tested throughout the year to assess body composition, daily energy expenditure (DEE), resting metabolic rate (RMR), physical activity and hormonal levels. After 1 year, all mouse lemurs seemed in good health. CR animals showed a significantly decreased body mass compared with the other groups during long day period only. CR or RSV treatments did not affect body composition. CR induced a decrease in DEE without changes in RMR, whereas RSV induced a concomitant increase in DEE and RMR without any obvious modification of locomotor activity in both groups. Hormonal levels remained similar in each group. In summary, after 1 year of treatment CR and RSV induced differential metabolic responses but animals successfully acclimated to their imposed diets. The RESTRIKAL study can now be safely undertaken on a long-term basis to determine whether age-associated alterations in mouse lemurs are delayed with CR and if RSV can mimic these effects.

Keywords Ageing · Food restriction · Resveratrol · Energy balance · Biomarkers · Doubly labelled water method

A. Dal-Pan · J. Terrien · F. Pifferi · R. Botalla · I. Hardy · J. Marchal · I. Chery · M. Perret · F. Aujard (✉)
Mécanismes Adaptatifs et Evolution,
UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique,
Muséum National d'Histoire Naturelle,
1 avenue du petit château, 91800 Brunoy, France
e-mail: aujard@mnhn.fr

P. Zizzari · J. Epelbaum
Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm,
Faculté de Médecine, Université Paris Descartes,
2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

J. L. Picq
Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie,
UFR Psychologie, Université Paris 08,
2 Rue Liberté, 93526 St Denis, France

A. Zahariev · I. Chery · S. Blanc
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS
Université Louis Pasteur,
23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

Introduction

The main causes of mortality in western countries are chronic age-associated diseases such as cardiovascular diseases, cancers, type 2 diabetes, osteoporosis and kidney diseases. These diseases have a genetic back-

ground but environmental factors such as nutrition play a key role (Mokdad et al. 2004). Since the pioneering study of McCay et al. (1935), we know that caloric restriction (CR) without malnutrition can delay the onset of such age-associated pathologies, delay ageing and increase lifespan in rodents. Observational data suggest that the relationship between longevity, energy balance and caloric intake could exist in humans but further investigations are needed.

Several hypotheses have been proposed for the biological mechanism underlying the life-extending and anti-ageing actions of CR, such as slowing growth, reducing body fat, altering apoptosis, decreasing body temperature and increasing physical activity, attenuating oxidative damage, reducing glycemia and insulinemia and modifying immune function (Campbell and Richardson 1988; Gredilla et al. 2001; Gardner 2005). It is likely that all these and others actions might indeed play a role and a unifying hypothesis was needed. The concept of hormesis might well provide such a hypothesis. This refers to phenomena in which the response of an organism to a chemical or physical agent is qualitatively different when the agent is of high intensity than when it is of low intensity (Rattan 2004). A 30% CR that delays the ageing processes is a low intensity stressor, which enhances the ability of rats, mice and monkeys of all ages to cope with intense stressors (Masoro 2006). The pathway by which CR enhances protective and repair processes has not yet been well elucidated. Recently, a mechanism was proposed for CR-induced effects in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Lin et al. (2000) demonstrated that the functional Sir2 gene is required for CR to increase replicative longevity in that species. More recently, an increasing amount of data has suggested that silent mating-type information regulation 2 homologous 1 (SIRT1), one of the seven mammalian orthologues of the yeast Sir2, regulates cell survival to a number of stressors and might be central to the effects of CR (Cohen et al. 2004; Picard et al. 2004; Rodgers et al. 2005; Bordone and Guarente 2005; Baur 2010).

Until the late 1980s, CR had not been tested in any animal model living longer than 4 years. Since then, studies in non-human primates, including rhesus and squirrel monkeys, have been in progress at the National Institute of Ageing (NIA) and the University of Wisconsin (UW) (Ingram et al. 1990; Lane et al. 1992; Kemnitz et al. 1993). The proportions of both rhesus and squirrel monkeys already dead in 2002 in the CR cohorts were about half of the controls (Lane et al. 2002). The most recent result from the UW primate study has indicated that adult-onset mild CR delays the onset of age-associated pathologies and promotes survival in rhesus monkeys (Colman et al. 2009) but this study has not yet shown any effect of CR on the maximum life expectancy of primates. Recently, a similar study was initiated on human subjects. Results at 6 months of CR are consistent to what has been observed in monkeys and rodents in terms of lower metabolic rate, body temperature and insulin and reduced DNA damage (Heilbronn et al. 2006).

Further studies are needed to test the validity of the CR paradigm in non-human primates to delineate the still debated mechanisms by which CR extends lifespan and ultimately test the molecules or interventions that will mimic the effects of CR and be relevant to humans. The present study "RESTRIKAL" aims to investigate the long-term effects of CR or supplementation with a mimetic compound (resveratrol; RSV) on the ageing process and lifespan of a non-human primate and highlight similar action pathways in both treatments. In that respect, the main originality of this study lies in the animal model, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) whose size (60–110 g) and life expectancy (8–10 years) will allow obtaining longevity data in 5 years only. *M. murinus* is a nocturnal prosimian primate originating from Madagascar. The grey mouse lemur presents special characteristics that make it a unique model to investigate energy regulation and ageing processes. Firstly, it displays a strong seasonal rhythm linked to photoperiod that is associated with natural and massive winter obesity i.e. an important increase in body mass due to fat storage in only a few weeks (Génin and Perret 2000). Secondly, grey mouse lemurs exhibit very marked daily rhythms with periods of heterothermia during their diurnal resting phase (Perret and Aujard 2001). These phases of daily heterothermia, very rare in primates, are an efficient mechanism of energy saving in small mammals (Terrien et al. 2009a) and thereby a good response index to energy stresses. It is also a unique model to assess the importance of biological rhythms on the processes of ageing and longevity. For example, a weakened and fragmented locomotor activity rhythm during normal ageing has been demonstrated in this primate (Cayetanot et al. 2005). The longevity of this primate is adequate for performing longitudinal studies,

and several biomarkers of ageing have already been validated in the mouse lemur colony, in particular decrease in sexual and aggressive behaviours (Aujard and Perret 1998; Nemoz-Bertholet et al. 2004), decrease in sexual hormones (Aujard and Perret 1998), melatonin (Aujard et al. 2001), DHEA-S (Perret and Aujard 2005) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Aujard et al. 2010), cognitive impairments (Picq 2007) and MRI-evaluated cerebral atrophy (Dhenain et al. 2003; Kraska et al. 2009). Moreover, it has recently been demonstrated that the energy balance of aged mouse lemurs is impaired in response to cold exposure (Terrien et al. 2009b). The first aim of this study is to determine whether CR can modify the physiological processes in the grey mouse lemur that lead to a delay in age-related diseases and an increase in lifespan.

The second aim of this study is to determine whether RSV, a natural polyphenolic compound that activates proteins implicated in energy metabolism homeostasis, could be used as a mimetic compound of CR. Indeed, CR will be very difficult to implement in humans because of social and practical constraints. In the past 5 years, numerous studies have focused on the development of "CR mimetic" compounds that would minimise many age-related diseases in humans without a reduction in caloric intake (Weindruch et al. 2001; Chen and Guarente 2007; Ingram et al. 2007; Wakeling et al. 2009). Among them, RSV seems to be a promising molecule (Howitz et al. 2003; Borra et al. 2005; Lagouge et al. 2006; Allard et al. 2009; Anderson and Prolla 2009). Trans-RSV, the most active form of RSV, has been the subject of many *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies to test its various and promising anti-inflammatory (Donnelly et al. 2004), anti-oxidant (Iannelli et al. 2007), anti-cancer (Baur et al. 2006), metabolic and cardiovascular (Shanmuganayagam et al. 2007) properties.

Although RSV effects share many metabolic similarities with CR (Barger et al. 2008) and although it seems to be a promising molecule to delay the incidence of age-associated chronic diseases (Athar et al. 2007), its metabolic effects in primates are still unknown. Indeed, relatively low concentrations can extend yeast, worm and *Drosophila* lifespan in a Sir2-dependent manner by mimicking CR (Wood et al. 2004). More interestingly, RSV can activate SIRT1, the most studied mammalian orthologue of Sir2, in humans (Borra et al. 2005). Most recently, several studies have also demonstrated RSV can stimulate AMPK activity in mice (Dasgupta and Milbrandt 2007; Canto et al. 2009). These results highlight that RSV could play an important part in energy regulation processes. RSV treatment also reduces the signs of ageing in mice but does not increase the longevity of *ad libitum*-fed animals when started at midlife (Pearson et al. 2008). However, non-human primates and humans present metabolic responses to a long-term CR and mimetic compound that might differ slightly from what was repeatedly observed in rodents and other lower organisms (Heilbronn et al. 2006; Colman et al. 2009; Witte et al. 2009). For example, CR in mice down-regulates genes involved in oxidative stress and reduces oxidative damage, lipid peroxidation and protein carbonyls (Sohal et al. 1994; Dubey et al. 1996; Lee et al. 1999; de Oliveira et al. 2003). In non-human primates, genes involved in protection against oxidative stress are not altered by CR, although protein carbonylation is reduced (Zainal et al. 2000). More data on primates are needed. Thus, the third goal of the study is to define whether CR and RSV act through similar pathways by stimulating sirtuins in the mouse lemur. This point will be developed in future years of the study.

Since the beginning of the RESTRIKAL study, a battery of tests has been performed on adult grey mouse lemurs at regular intervals until their natural death to assess the impact of both treatments on energy metabolism modification and the ageing process. These tests were selected to assess parameters changing with chronological ageing. They are minimally invasive and appropriate for a longitudinal study. Several indices of energy balance were measured such as body mass gain, food intake, body composition, resting metabolic rate (RMR) and physical activity. Concerning endocrine systems, IGF-1 levels were measured because this hormone is a modulator of energy balance and an ageing marker that declines with time (Aujard et al. 2010). Indeed, genetic alterations in the human IGF-1 receptor that result in an altered IGF signalling pathway seem to be linked to human longevity, suggesting a role of this pathway in the modulation of human lifespan (Suh et al. 2008). Testosterone levels are also measured to highlight possible effects on sexual behaviour and, notably, test if the balance between reproduction cost and survival of grey mouse lemurs is modified. The first-year outcome of this longitudinal follow-up

demonstrates the validity of CR and RSV interventions for assessing whether they can delay ageing in a non-human primate. We expect that the present study will provide novel insights into the biology of ageing by testing the effect of CR or RSV treatment on a non-human primate model. We expect that CR will increase lifespan in the grey mouse lemurs and decrease markers of several chronic diseases. Lastly, we expect that RSV stimulation of the sirtuin pathway will mimic the effect of CR. In the long run, such a study might allow us to develop nutritional strategies to delay the effect of ageing.

Experimental procedures

Animals and animal care

The 42 male grey mouse lemurs (*M. murinus*, Cheirogaleidae, primates) used in this study were born in the laboratory breeding colony at Brunoy, France (agreement A91-114-1) from stock originally caught more than 40 years ago on the southwest coast of Madagascar. All animals were included in a single cohort at the age of 38±1 months, which is considered an adult age in this species. The project began at the onset of the winter-like season in the lab. The general conditions of captivity were maintained with respect to ambient temperature (25°C) and relative humidity (55%). The grey mouse lemur is a nocturnal primate that shows high levels of locomotor activity and normothermic body temperature during the night. Just before the onset of the light phase, it enters a torpid state during which it decreases its body temperature and metabolic rate until 4 to 6 h after the beginning of the day when its body temperature returns to normothermic values. The mouse lemur exhibits photoperiod-dependent seasonal variations in most of its physiological functions. Another interesting particularity of this species is its body mass gain during winter. Indeed, at the beginning of winter the body mass of the grey mouse lemur increases by approximately 50% to 70% and only returns to basal levels in the summer. In the breeding colony, animals are exposed to an artificial photoperiodic regimen consisting of six months of summer-like long day length (14:10 h light-darkness, LD) and 6 months of winter-like short day length (10:14 h light-darkness, SD). These photoperiodic regimens are sufficiently discriminating to induce radically different physiological and behavioural responses, as observed in nature in Madagascar. The change of photoperiod occurred abruptly without any significant disturbance for the animals. To minimise social influences during the different experiments, animals were housed individually in 1 m^3 cages, provided with a nest and supports and separated from each other by metallic partitions. Animals were weighed once a week to monitor body mass variations. All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and French national laws.

Dietary interventions

Animals were fed with the same standard diet used in the laboratory breeding colony and in recent publications using the same animal model (Génin and Perret 2003; Giroud et al. 2008b; Giroud et al. 2010). They were fed with fresh fruit (banana and apple) and a daily mixture made up of cereals, milk and egg. This diet is composed of 61% carbohydrates, 23% proteins and 16% lipids. Water was always given *ad libitum*.

After a 2-week habituation phase, animals were randomised to the following groups. An *ad libitum* control (CTL) group of 14 animals was fed with the standard diet. The daily amount of food given to the animals (15 g of mixture and 6 g of fresh fruit per day, equivalent to 105 kJ/day on average) was estimated from preliminary internal studies of the Brunoy laboratory over a year of measuring spontaneous food intake in isolated control adult animals (unpublished data). During the first 2 weeks of the SD period, animals remained undisturbed and more food (169 kJ/day) was given to allow annual fattening. Then, the amount was progressively decreased (128 kJ/day in the third week, 116 kJ/day in the fourth week) until the fifth week when the amount of food was fixed for the rest of the year (102 kJ/day). A CR group of 14 animals was fed the same diet but received 30% less than the CTL group, which corresponded to an average of 71 kJ per day (i.e. 10 g of mixture and 4 g of fresh fruit per day). This restriction was based on several studies on different species (Lane et al. 2000; Blanc et al. 2003). It was applied throughout the year, except during the critical period of fattening. During the first 3 weeks of the SD period, CR animals received the same amount of

food as the CTL group to allow them to fatten normally and, after these first 3 weeks, the 30% caloric restriction applied was the same during SD and LD periods. Finally, a third group (RSV group) of 14 animals was fed with the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of RSV per kilogram bodyweight per day (Sequoia Research Products, UK). This dosage was selected from the literature from studies in rodents, and was intermediate between the 40 mg/kg.d^{-1} of Baur et al. (2006) and the 400 mg/kg.d^{-1} of Lagouge et al. (2006). To know exactly the quantity of food really ingested by the animals, daily leftovers were measured and corrected for water evaporation.

Daily energy expenditure, body composition and water turnover

Measurements were performed twice a year on 12 of the 14 animals in each group in the first weeks following each dietary shift (SD1, LD1) (Fig. 1). Daily energy expenditure (DEE) was measured over a 3-day period using the doubly labelled water (DLW) method (Blanc et al. 2000). Animals were weighed before the experiment to determine the dose of DLW to be injected. After urine collection for the determination of basal enrichments, animals were injected in the intraperitoneal cavity with 2.3 g/kg of a pre-mixed solution composed of 0.55 g/kg $H_2{}^{18}O$ (Rotem Industries, Israel) and 0.15 g/kg ^2H_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) diluted in 10 g of NaCl 9‰ to maintain osmolarity. These quantities of isotopes ensured in vivo enrichments of deuterium in the order of 300 ppm and 2,400 ppm for oxygen-18. Isotopic equilibration in total body water (TBW) was determined from a blood sample collected using a glass capillary at 1 h post-dose from the saphenous vein. Immediately after sampling, the capillary tubes were flame-sealed to prevent isotopic exchanges. The mouse lemur was then released into its cage and urine samples were collected in cryogenically stable tubes 24, 48 and 72 h after blood sampling. Blood and urine samples were respectively stored at 5°C and –20°C until analyses by isotope ratio mass spectrometry.

Water from serum and urine samples were extracted by cryo-distillation, as previously described (Gilbert et al. 2007). A 0.1 µL of water was reduced to hydrogen and carbon monoxide by reduction on a glassy carbon reactor held at 1,400°C in an elemental analyser (Flash HT, Thermofisher, Germany). Hydrogen and carbon monoxide gases were separated by a gas–liquid chromatography column held at 104°C coupled to a continuous flow Delta-V isotope ratio mass spectrometer. Isotopic abundances of deuterium and 18-oxygen in hydrogen and carbon monoxide gases were measured in quintuplicate and repeated if SD exceeded 2‰ and 0.5‰, respectively. All enrichments were expressed as International Atomic Energy Agency standards. CO_2 production was calculated according to the single pool equation of Speakman (Blanc et al. 2000): $rCO_2 = (N/2.078) \times (ko - kd) - 0.0062 \times kd \times N$,

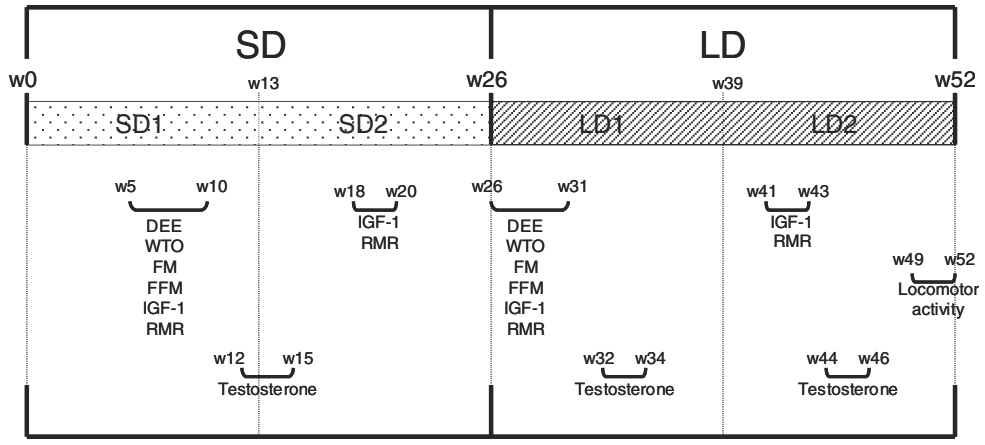


Fig. 1 Experimental schedule during the first year of the RESTRIKAL study. Daily energy expenditure (*DEE*), water turnover (*WTO*), fat mass (*FM*) and fat-free mass (*FFM*) were assessed twice a year. Measurement of insulin-like growth factor type 1 (*IGF-1*) level and resting metabolic rate (*RMR*) were performed four times a year. Testosterone level analysis was performed three times a year, once in SD and twice in long days (*LD*) period. Locomotor activity was tested once a year at the end of the LD period during which the animals remain relatively active (*w* week)

where N represents the average isotope dilution space of oxygen-18 calculated from Coward (1990) by the plateau method using the 1 h post-dose sample. ko and kd represent the isotope constant elimination rates calculated by linear regression of the natural logarithm of isotope enrichment as a function of elapsed time from day 1 samples. DEE was calculated by Weir's equation (Weir 1949) using a food quotient of 0.86 estimated from the animal's diet. TBW was measured from the dilution space of 18-oxygen after correction for exchange by the factor 1.007 (Racette et al. 1994). Fat-free mass (FFM) was calculated from TBW by assuming a hydration coefficient of 73.2%, which was shown to be unchanged by chronic CR (Blanc et al. 2005). Fat mass (FM) was calculated as the difference of FFM from body mass. Water turnover was assessed by the multiplication of the average isotope dilution space of oxygen-18 (N) with the deuterium constant elimination rate (kd) and corrected for isotope fractionation (Blanc et al. 2000). FFM and FM were expressed in g, TBW was expressed in % and DEE was expressed in kJ/day.

Resting metabolic rate

Oxygen consumption was measured with a closed circuit respirometer. This protocol was applied four times per year, in the first and last third of each photoperiod (SD1, SD2, LD1 and LD2) (Fig. 1). All the animals were experimented with this procedure (13 CTL, 14 CR and 14 RSV). For this nocturnal species, RMR measurements on post-absorptive animals were performed during their daily resting period, 4–6 h after the beginning of the light period to avoid torpor metabolism. Animals were trained to nest in the respiratory chamber that consisted of an opaque chamber of 2.5 l with a woven floor to absorb any urine. During the experiment, the respiratory chamber was placed in a cabinet at a controlled ambient temperature of 25.0±0.5°C, a value within the thermoneutral zone defined for the mouse lemur (Aujard and Perret 1998). After a 20 min habituation phase under constant air-flow ventilation (2 l.min^{-1}) drawn through the respirometry chamber from bottom to top; the chamber was closed for a 40 min period. VO_2 consumed by the animal was calculated from initial and final concentrations of O_2 in the chamber that were measured on dried gas using a Servomex 570 A paramagnetic gas analyser (accuracy 0.01% O_2). The analyser was routinely calibrated with N_2 and atmospheric air. O_2 consumption was expressed as ml O_2 h^{-1}. O_2 consumption was adjusted for the body weight of the animal (Blanc et al. 2003). Body temperatures were not measured before the experiment to avoid disturbance of the sleeping animal but males never entered deep torpor at an ambient temperature of 25°C.

Spontaneous locomotor activity

Spontaneous locomotor activity was estimated once a year at the end of the LD period, during their breeding season, when the animals are more active (Aujard et al. 2007) (Fig. 1). For technical reasons, only five CTL, nine CR and seven RSV followed this protocol. Spontaneous locomotor activity was estimated using a device with presence and motion sensors adapted to the mouse lemur (homemade system developed in the laboratory). The apparatus was placed in an ambient temperature controlled room (25°C). Animals were housed individually in a cage with a capacity of 1 m^3 each provided with nest and supports. Each animal was placed in a totally closed wooden nest, except for both sides of the nest on which were placed eight presence sensors (Honeywell, transmitter: SEP8705003, receiver: SDP8405014) to know when the animal was in the nest. These presence sensors were continuously recording. Moreover, two motion sensors (Gardtec, Gardscan 'M' series infrared detectors) were placed in the corners of the cage to detect the spontaneous movements of the animal during its activity period. If the animal was in movement, the motion sensors recorded data every two seconds. Thus, data were expressed in arbitrary units (a.u.). Data were stored in a computerised system (developed in the laboratory). They were then computed to represent the time course of these movement patterns using a software filtering "Actocebe 3.0" developed in language G from National Instruments. Total movements were averaged at 5-min intervals for further analysis.

Hormonal assays

Blood collections were taken via the saphenous vein of the animals, without anaesthesia, at the end of their resting phase before the food allotment became available. Blood was collected in capillary tubes containing EDTA and immediately centrifuged

(7,000 rpm at 4°C for 30 min) after collection. One hundred microlitres was collected per sampling and represented less than 2% of the blood volume of the animal. Plasma was stored at –80°C.

Blood sampling for IGF-1 level analysis was performed four times a year, in the first and last third of each photoperiod (SD1, SD2, LD1 and LD2) (Fig. 1). IGF-1 level was measured for 11 animals by group, using an IGF-1 IRMA kit (Immunotech SA, Marseille Cedex, France). A dilution step was performed before the assay to dissociate IGF-1 from its binding proteins. The antibodies used in this immunoassay are highly specific for IGF-1 (extremely low cross-reactivity against insulin, pro-insulin, IGF-2 and growth hormone). The intra-assay coefficient of variation was 6.3% and inter-assay coefficient of variation was 6.8%. Assay sensitivity was 2 ng/ml. Values were expressed in ng/ml.

Blood sampling for testosterone level analysis was performed three times a year, in the middle of the SD period and twice during the LD period, which is the activity period of grey mouse lemur (SD, LD1 and LD2) (Fig. 1). Testosterone was analysed for 12 CTL, 11 CR and 11 RSV. Testosterone was assayed using the testosterone ELISA kit DE1559 (Demeditec, Kiel, Germany), which measures the total testosterone in plasma (expressed in ng/ml). After two distinct periods of incubation of 60 and 15 min with the different reagents, the optical density was read with a spectrophotometer at 450 nm (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA). Assay sensitivity was 0.083 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation was 6.7% and inter-assay coefficient of variation was 9.7%. Values were expressed in ng/ml.

Testis size variations of each animal, expressed as a scale in a.u., was assessed once a week by the same person to complete the testosterone level analysis by estimating visually their sexual status (if there was no testis, a score of zero was given, if the testis began to appear, a score of one and when the testis were well developed, a score of two).

Mortality data

Animals are followed until their spontaneous death. All animals that will die during the study undergo a complete autopsy by a veterinarian. Based on specific criteria (rapid body mass loss, anaemia, difficulty breathing), dying animals will be deeply anaesthetised. After autopsy will be completed, all organs will be harvested and kept for future analysis. Special attention will be give to the mouse lemur's brain to check it for Alzheimer-like pathology.

Sample size

For calculation, we chose the increase in the mean lifespan as the primary outcome. In the breeding colony of the Brunoy laboratory, analysis of survival from 254 male mouse lemurs allowed us to determine the mean lifespan (mean ± SEM: 6.0±0.2 years), the mean lifespan of the 10% longest living animals (10.0 ±0.2 years) and the observed maximal survival duration (12.0 years). Based on literature (Lin et al. 2000; Tissenbaum and Guarente 2001, Anderson et al. 2003; Howitz et al. 2003; Ingram et al. 2006; Valenzano et al. 2006), we expected that the mean lifespan of the restricted and the RSV-supplemented groups would increase by a minimum of 30%. With this parameter, assuming a common standard deviation of 5% and a power analysis of 80%, a sample size of 12 individuals per group was required. We chose to increase the groups size (n=14) to compensate the effect of early hazardous deaths in reducing statistical powers of metabolic and behavioural variables measured throughout the time course of the study during the project. The actual total power will be recalculated *a posteriori*.

Statistical analysis

Because of the large amount of data gathered during this longitudinal study, an Access database was created to comprehensively analyse all the results. For technical and setup reasons, the number of animals used for each experiment varied, especially for the locomotor activity monitoring, which was planned after the beginning of the project. Moreover, one animal of the CTL group suffering from a urinary tract infection died during the first year of this study and was removed from the analysis. All values are expressed as mean ± SEM. After checking for the normality of the distribution, ANOVA or repeated ANOVA for related samples was used to assert significant variations in all studied parameters. Data from average seasonal body mass plateaus and IGF-1 levels were log-transformed to obtain data with a normalised distribution. Adjustments of FFM, RMR

and TEE for body size were performed by analysis of covariance with a fluctuating slope model. Comparisons were considered to differ significantly when $p<0.05$. All statistics were performed by SYSTAT for Windows (V9, SPSS Inc., USA).

Results

Seasonal variations in the weekly average percentage of spontaneous food ingested related to the amount of food given and seasonal variations in body mass are represented in Fig. 2. The percentage of calories ingested (CI) significantly varied throughout the year (Fig. 2a). In CTL animals, a spontaneous and progressive decrease in CI was observed during the SD period to reach a minimum of 75% (76 kJ/day) in the last third of the SD period. CI was higher in LD with an average of 92% (90 kJ/day) in the second part of the LD period. CI always remained below 100% (102 kJ/day), confirming that CTL animals were always fed *ad libitum*. RSV animals exhibited similar seasonal variations in CI compared with CTL, except at the beginning of LD. Indeed, CI increased rapidly in the RSV group after the shift to LD, whereas the increase was more progressive in the CTL group. CR lemurs demonstrated higher percentages of CI throughout the year compared with CTL and RSV lemurs. Seasonal variations were less marked, but a spontaneous decrease in CI during SD was still

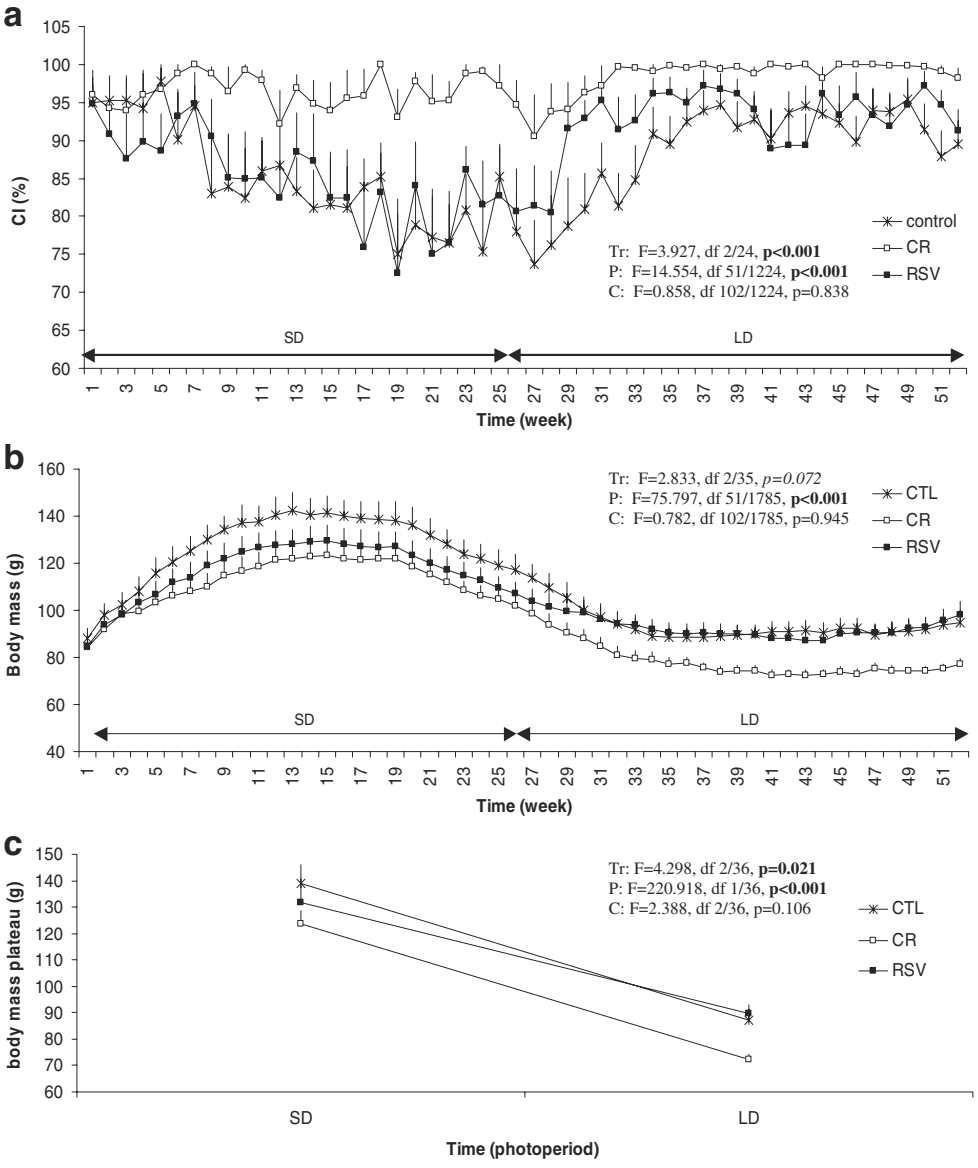


Fig. 2 Effects of caloric restriction (*CR*) or resveratrol supplementation (*RSV*) on seasonal variations in percentage of calories ingested (*CI*) (**a**), body mass gain (**b**) and body mass plateaus (**c**). Data of the comparison of mean body mass gain during the short days (*SD*) and long days (*LD*) plateaus were log-transformed. Plateaus were calculated from weeks 13 to 19 for the SD period and weeks 38 to 44 for the LD period. ANOVA results are reported on the right side of the graphs, for treatment (*Tr*), photoperiod (*P*) or crossed effects (*C*) on the percentage of CI and body mass changes during the first year of CR or RSV supplementation compared to control feeding (CTL) in SD and LD animals (n=13 for CTL group, n=14 for CR group, n=14 for RSV group). p in *bold* means value is significant and p in *italic* means value is not significant but shows a trend. Values are expressed as mean ± SEM

observed (p=0.046). CR animals ingested an average 95% (68 kJ/day) of their food portion during SD and 98% (70 kJ/day) during LD. The percentage of restriction really applied throughout the year was less than 30% (19±1% in SD and 24±1% in LD).

As shown in Fig. 2b, the animals presented an initial average body mass of 90±5 g. All animals fattened during the first 12 weeks of the SD period to reach a plateau of 131±8 g about 8–9 weeks before decreasing their body mass until another plateau of 83±9 g in the middle of the LD period (Fig. 2b, p<0.001). Across the first year of the study, body mass did not significantly differ between the three groups even though a trend effect of treatment was observed (p=0.072). However, when the data were split by seasons, CR animals presented a lower body mass compared with CTL and RSV groups during the second half of the LD period (74±2 vs. 87±4 and 90±3 g, respectively, p=0.021, Fig. 2c).

Analyses of body composition, DEE and water turnover following each new photoperiod are represented in Fig. 3. These parameters measured the short-term effect of treatment (within the second month following the first shift to SD) and the effect of 6 months of treatment (within the first month following the next shift to LD). Body mass at the time of these measures varied significantly according to season, with higher values in SD than in LD, but did not vary significantly according to treatment (Fig. 3a). There was no significant effect of time or treatment on FFM values (75±2 g for CTL, 72±3 g for CR and 73±2 g for RSV in SD and 71±1 g for CTL, 68±2 g for CR and 76±2 g for RSV in LD, Fig. 3b). However, a crossed effect close to significance was observed, with a decrease in FFM in LD compared with SD for CTL and CR animals, whereas inversely RSV-treated lemurs increased their FFM in the LD season. By contrast, a clear effect of season was observed for FM values with higher levels of FM in SD than in LD, without any significant effect of treatment (Fig. 3c). TBW did not differ between the three groups whatever the photoperiod, but it varied similarly between SD and LD for each group (46±1% in SD and 57±1% in LD) (Fig. 3d). Water turnover did not differ according to photoperiod or treatment but the cross effect was almost significant (p=0.055). CR and RSV groups presented lower values in SD compared with the CTL group and maintained similar levels of water turnover in LD compared with SD, whereas CTL animals showed decreased water turnover rate in LD compared with SD (Fig. 3e). The evaluation of DEE revealed a significant effect of treatment with no global effect of season. CR animals exhibited lower values of DEE than CTL and RSV animals in both photoperiods, and RSV animals exhibited higher DEE values than the two other groups in LD only (Fig. 3f). These effects were maintained when DEE was adjusted to body mass (Fig. 3g).

RMR varied according to photoperiod and treatment (crossed effect: F=2.450, df 6/114, p=0.029) (Fig. 4). In CTL animals, RMR was higher in early SD and late LD. CR animals presented similar RMR values compared with the CTL group throughout the year (p=1.000). By contrast, the RMR values of the RSV group significantly increased throughout the year (p=0.011). Significant differences appeared between the groups. In LD1, RMR was higher for the RSV group compared with CTL (p=0.044). In LD2, this difference between RSV and CTL was even more pronounced (p=0.003). During the late LD season, spontaneous daily locomotor activity was no different between the three groups of animals (1,987±630 a.u. for CTL, 2,644±457 a.u. for CR and 1,379±338 a.u. for RSV, p=0.157) (Fig. 5).

IGF-1 levels significantly varied according to photoperiod (p<0.001), with lower values in early SD and late LD in all groups (Fig. 6). Despite a trend for a global treatment effect, IGF levels were not significantly different between the three groups whatever the photoperiod (p=0.078).

Highly significant differences in testis size (Fig. 7a) and testosterone levels (Fig. 7b) occurred between each photoperiod (p<0.001) but treatment did not affect these parameters (p=0.726 and p=0.203, respectively).

Discussion

The RESTRIKAL project aimed to compare for the first time the effects of a long-term CR or a mimetic compound supplementation on multiple ageing processes in a heterothermic primate. After 1 year, all mouse lemurs appeared in excellent health, suggesting no detrimental effect of both diets. Expected variations because of photoperiodic entrainment were present in all groups. Neither CR nor RSV supplementation affected photoperiodic variations in FFM, FM, TBW, water turnover, IGF-1

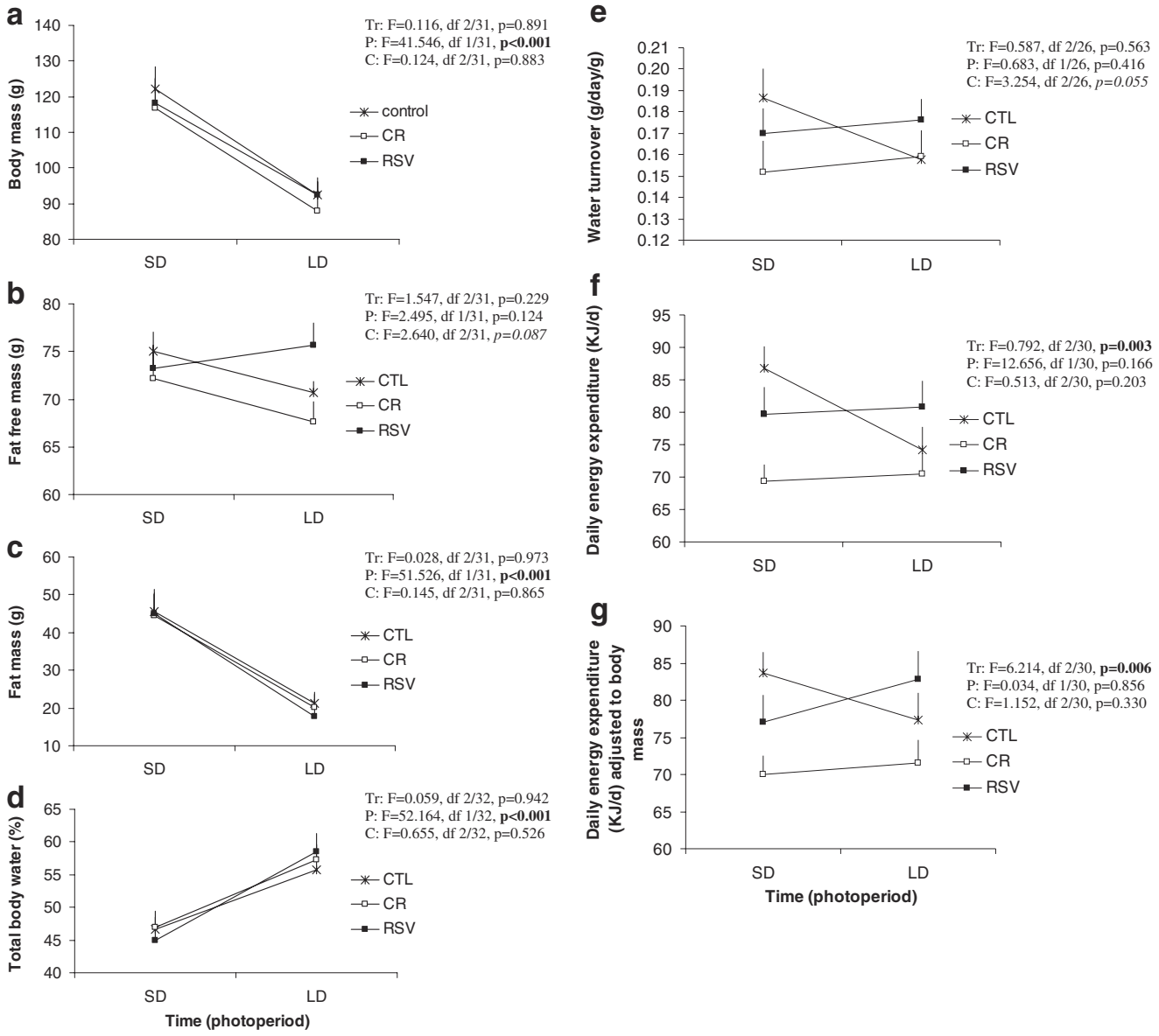


Fig. 3 Effects of photoperiod and treatment on body mass at the time of the experiment (**a**), fat-free mass (**b**), fat mass (**c**), total body water (**d**), water turnover (**e**), daily energy expenditure (**f**) and daily energy expenditure adjusted to body mass (**g**). ANOVA results are reported on the right side of the graphs, for treatment (*Tr*), photoperiod (*P*) or crossed effects (*C*) on body mass, fat-free mass, fat mass, total body water, water turnover and daily energy expenditure adjusted or not to body mass during the first year of caloric restriction (*CR*) or resveratrol (*RSV*) supplementation compared to control feeding (CTL) in short days (*SD*) and long days (*LD*) animals ($n=12$ for each group). *p* in *bold* means value is significant and *p* in italic means value is not significant but shows a slight trend. Values of body mass, fat-free mass and fat mass are expressed in g; values of total body water are expressed in %; values of water turnover are expressed in $g.day^{-1}.g^{-1}$ of animal; values of daily energy expenditure are expressed in $kJ.day^{-1}$. All parameters are expressed as mean ± SEM

levels or testosterone levels. However, the evolution of FFM and water turnover in RSV-supplemented animals presented several differences compared with controls. Indeed, FFM and water turnover values in the RSV group varied in an opposite manner to the CTL group. Moreover, the RSV group exhibited higher values of DEE at the beginning of the LD period and a strong increase in RMR without any increase in spontaneous daily locomotor activity at the end of the LD period. Lastly, although body mass values did not differ between groups during the SD photoperiod, CR animals presented with a significant decrease of their body masses at the end of the LD period.

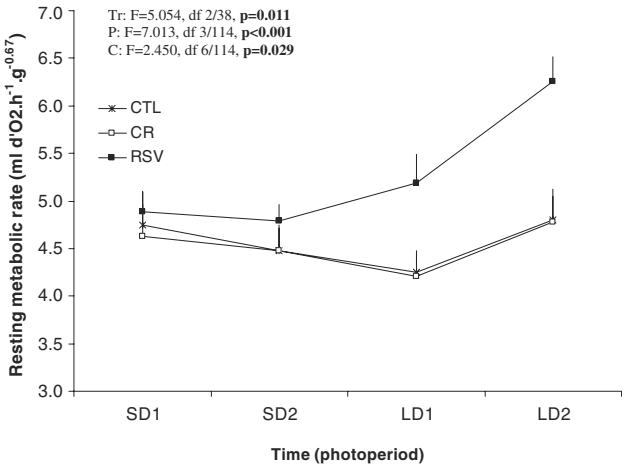


Fig. 4 Effects of photoperiod and treatment on resting metabolic rate. ANOVA results are reported on the graph, for treatment (*Tr*), photoperiod (*P*) or crossed effects (*C*) on resting metabolic rate changes during the first year of caloric restriction (*CR*) or resveratrol (*RSV*) supplementation compared to control feeding (CTL) in short days (*SD*) and long days (*LD*) animals (n=13 for CTL group, n=14 for CR group, n=14 for RSV group). p in *bold* means value is significant. Values are expressed in ml $O_2.h^{-1}.g^{-0.67}$ as mean ± SEM

Exposed to a SD photoperiod, mouse lemurs fattened quickly and, after 2–3 months, exhibited a spontaneous reduction of their caloric intake (Génin and Perret 2000). Consequently, CR was proportionally less severe in SD than LD (21% vs. 30%, respectively). Therefore, the body mass of CR animals did not differ

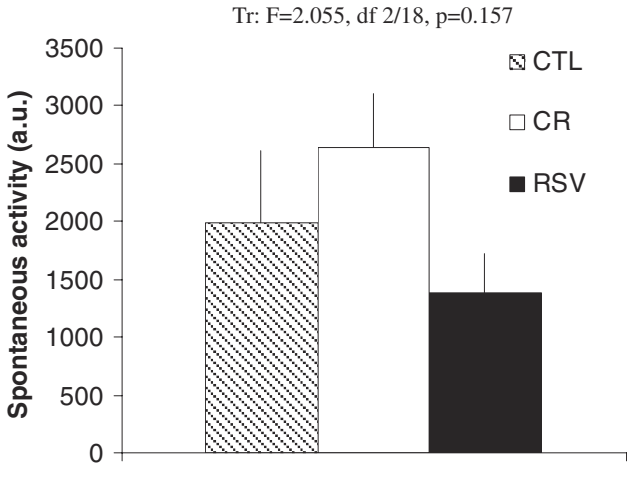


Fig. 5 Effects of treatment on daily spontaneous locomotor activity. ANOVA results are reported on the graph, for treatment (*Tr*) during the first year of caloric restriction (*CR*) or resveratrol (*RSV*) supplementation compared to control feeding (CTL) in long days (*LD*) animals only (n=5 for CTL group, n=9 for CR group, n=7 for RSV group). Values are expressed in a.u. as mean ± SEM

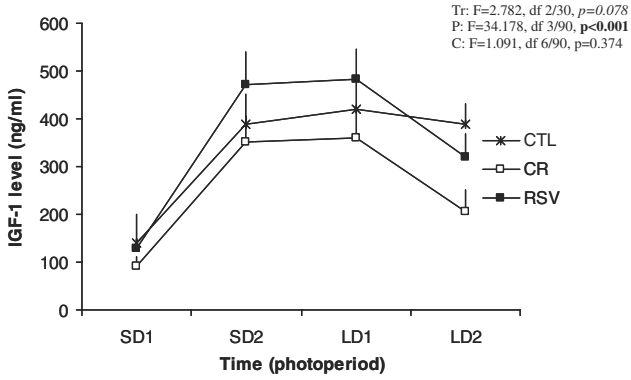


Fig. 6 Effects of photoperiod and treatment on plasma insulin-like growth factor type 1 (*IGF-1*) level. Data were log-transformed for statistical analysis. ANOVA results are reported on the right side of the graph, for treatment (*Tr*), photoperiod (*P*) or crossed effects (*C*) on IGF-1 level changes during the first year of caloric restriction (*CR*) or resveratrol (*RSV*) supplementation compared to control feeding (CTL) in short days (*SD*) and long days (*LD*) animals (n=11 for each group). p in *bold* means value is significant and p in *italic* means value is not significant but shows a slight trend. Values are expressed in ng/ml as mean ± SEM

from those of controls during the first 6 months of this study i.e. the SD period. Accordingly, IGF-1 levels were not modified. However, at the end of the LD photoperiod, restricted animals exhibited a lower body mass than controls and, although not significantly different, their IGF-1 levels were reduced. A similar decrease in IGF-1 levels has been demonstrated in mice exposed to moderate CR after 24 weeks of treatment (Huffman et al. 2008).

The neuroendocrine system involving GH and IGF-1 mediates some of the metabolic consequences of caloric excess or restriction (Smith 1996). Obesity is associated with increases in levels of free IGF-1 (Nam et al. 1997) and free fatty acids, both of which are known to decrease GH secretion through a negative feedback mechanism (Lee et al. 1995). Endocrine changes under CR have been extensively studied in rodents (Shimokawa and Higami 2001). Weight loss, as observed with a restricted diet, is accompanied by a decrease in both free fatty acids and free IGF-1 levels, leading to a potential increase in GH secretion (Smith 1996). However, IGF-1 and GH levels were unaffected in humans after a 6 month-period of CR (Redman and Ravussin 2009).

Human ageing is marked by a reduction in both GH and IGF-1 concentrations in healthy adults (Veldhuis et al. 2005). Some of the anti-ageing actions of CR involve the modification of several

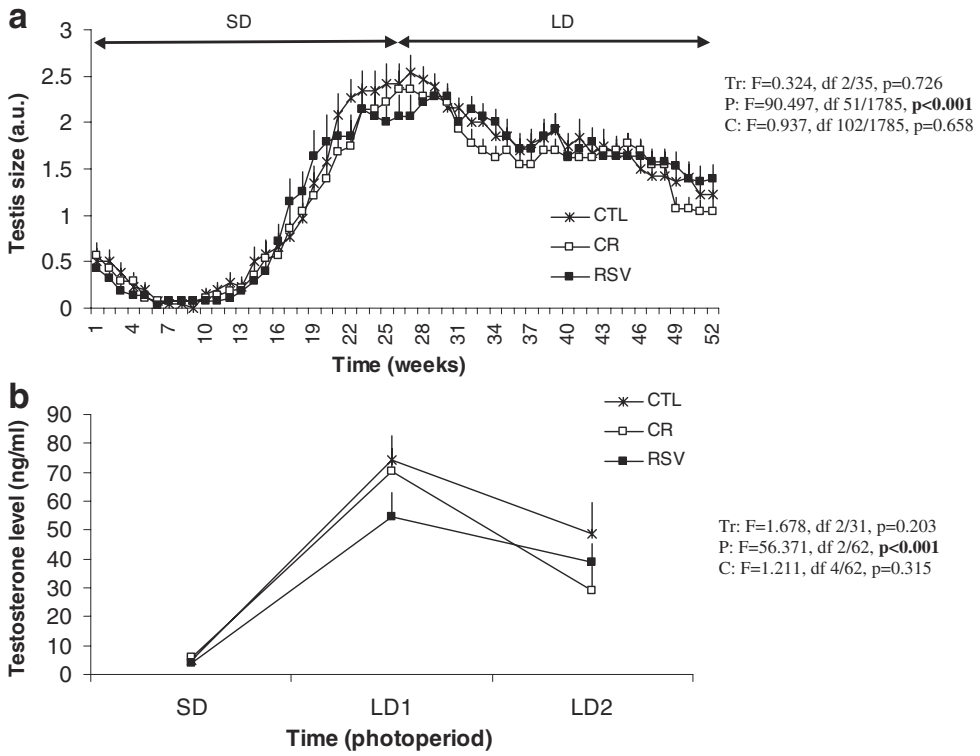


Fig. 7 Effects of photoperiod and treatment on testis size (**a**) and testosterone level (**b**). ANOVA results are reported on the right side of the graphs, for treatment (*Tr*), photoperiod (*P*) or crossed effects (*C*) on testis size and plasma testosterone level during the first year of caloric restriction (*CR*) or resveratrol (*RSV*) supplementation compared to control feeding (CTL) in short days (*SD*) and long days (*LD*) animals ($n=12$ for CTL group, $n=11$ for CR group, $n=11$ for RSV group). p in bold means value is significant. Values of testis size are expressed in a.u. and values of testosterone level are expressed in ng/ml. Both parameters are expressed as mean ± SEM

neuroendocrine pathways but they remain to be studied (Berner and Stern 2004; Meites 1989). In some mammalian species, CR can reduce the age-related IGF-1 decline (Berryman et al. 2008). However, the observed decrease in IGF-1 levels after 1 year of CR in mouse lemurs cannot be attributed to ageing alone. Indeed, in this primate age-related changes in IGF-1 levels are characterised by a progressive decrease during the SD photoperiod, whereas levels remain high during the LD photoperiod even in old age (Terrien et al. 2009a; Aujard et al. 2010). It is most likely that changes in metabolism account for the decrease in IGF-1 in mouse lemurs at the end of the LD period.

Animals under moderate CR adapted quickly to the protocol. Indeed, body composition as reflected by FM, FFM and TBW was not modified by CR. However, during the SD photoperiod DEE was lower in restricted animals compared with control ones. Similar results were found in rhesus monkeys subjected to a 30% reduction in caloric intake after several years of treatment (Raman et al. 2007). The reduction in DEE in the grey mouse lemurs has to be related to its ability to enter daily torpor to conserve energy in the face of environmental constraints (Terrien et al. 2009a). Mouse lemurs exposed to moderate food shortage (Giroud et al. 2008a) exhibited an increasing frequency of daily torpor. Therefore, animals likely minimise energy expenditure and compensate for the effects of CR on body composition by entering deep torpor. Further studies should investigate the length and duration of torpor bouts in CR animals.

RMR, recorded after the daily torpor bout of each animal, was not different between control and CR animals. By contrast, the RMR of human subjects placed under a 25% CR decreases after three months compared with controls (Martin et al. 2007). In our experiments, the percentage of CR applied in the mouse lemur might not be sufficient to induce RMR variations or the duration of treatment (1 year) might not be long enough to induce significant modifications. At any rate, this lack of change in RMR also suggests that the animals do not save energy during

their resting periods but probably during deeper torpor. Moreover, the CR group presented with lower values of water turnover compared with control animals, indicating greater water retention. This is probably because of the increased frequency of torpor bouts, an important mechanism in this species during SD photoperiods.

From the beginning of the LD photoperiod, all animals lost body mass. Body composition and related body mass did not differ between groups. The LD photoperiod corresponded to the breeding season with a general activation of physiological and behavioural parameters (Perret 1985). In particular, an increase of reproductive functions was expected. As reflected in this study, higher values of testosterone levels were observed for the CTL and CR groups in the LD period but we noticed no difference between the two groups. Interestingly, the expected increase in LD period-related water turnover was not observed for any group. Moreover, DEE did not differ between control and restricted animals. One possible explanation might be the period when these parameters were measured. Indeed, when the experimental design of this study was established, it was anticipated that animals would exhibit their most significant metabolic changes just after the photoperiodic shifts. However, changes in body mass and DEE as well as IGF-1 levels were more affected by dietary restriction in the second part of the LD period. Therefore, for the remaining years of the study, measurements will be made in the second part of the LD period.

During exposure to the LD photoperiod, CR impacted heavily on body mass variations of grey mouse lemurs (Génin and Perret 2003; Séguy and Perret 2005; Giroud et al. 2008a, b). In the LD photoperiod, mouse lemurs did not use daily torpor to avoid body mass loss even under a 40% CR (Giroud et al. 2008a). Moreover, this decrease of body mass could not be explained by changes in RMR or locomotor activity. Contrary to expectations, despite having less energy reserves, no increase in exploratory behaviour, as reflected by spontaneous daily locomotor activity, was observed in CR animals. Similar results were observed after several weeks of 40% CR in mouse lemurs in the LD photoperiod (Giroud et al. 2008a). However, when CR was higher, for example 80% (Génin and Perret 2003), a strong increase in locomotor activity was recorded, suggesting the active search of required food. In the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), an increase in activity levels has been observed for animals under a 30% CR (Weed et al. 1997). However, these results were only valid for the older male group followed in the NIA study. In monkeys, the literature in this domain was well developed, but the results obtained in the different studies did not allow to conclude about caloric restriction effects on locomotor activity (Kemnitz et al. 1993; Ramsey et al. 1996; Delany et al. 1999; Moscrip et al. 2000). Presently, how CR affects locomotor activity is unclear. As stressed by Ingram et al. (2001), the large variability of the results could be attributed to various factors such as the age and sex of the animals and different CR intensities and durations. Further studies will be necessary to highlight the reality of CR effects on the locomotor activity of primates.

Animals supplemented with RSV ate approximately the same amount of food as controls during both photoperiods and exhibited similar photoperiodic variations in their body mass and FM. In the SD photoperiod, their body composition, energy expenditure, RMR and hormonal level were similar to those recorded in the control group. Interestingly, the RSV group did not present any difference in body mass compared with the control group, suggesting that RSV does not mimic CR for this parameter, at least after a year of treatment.

However, the FFM of the RSV group was higher in LD period compared with the control group, with a high inter-individual variability. Animals might have developed a larger muscle mass as demonstrated in RSV-supplemented mice that displayed increased muscle strength in locomotor tests after several weeks of treatment (Baur et al. 2006; Lagouge et al. 2006). Moreover, RSV can stimulate in vivo muscle cell glucose uptake through sirtuins and AMPK (Breen et al. 2008), an effect possibly involved in the muscle mass increase of RSV-supplemented mouse lemurs. DEE was also modified by RSV treatment in mouse lemurs with higher values compared with controls at the beginning of the LD period. A similar trend was observed for water turnover. Lastly, contrary to the CR group, the RMR of RSV-supplemented animals was noticeably increased in the early and late stages of the LD period. This RSV effect on the RMR was already seen in a previous study where a 4-week

supplementation with RSV was sufficient to induce an increase of the grey mouse lemurs' RMR (Dal-Pan et al. 2010). Moreover, as for high-fat mice after several weeks of RSV supplementation (Lagouge et al. 2006), RSV seemed to activate significant energy metabolism of grey mouse lemurs, in particular their RMR.

In summary, a moderate CR or a mimetic compound supplementation was safely initiated in an adult heterothermic primate. First-year results of the study suggest a good adaptation of the animals to their diet. Preliminary results after 1 year of treatment suggest that RSV produces an activation of energy metabolism without body mass loss in contrast to CR, which produces a decrease of energy expenditure. Taken together, the effects of CR or RSV supplementation in grey mouse lemurs seemed more important during LD than during SD periods. Physiological and behavioural parameters are highly photoperiod-dependent in this primate, and it is likely that during LD photoperiods energy constraints are more important than during SD photoperiods, thereby leading to a more pronounced effect of the diet treatment. However, changes observed at the end of the LD period might also reflect the chronic effects of treatment after 1 year. The respective roles of this photoperiodic dependency and duration of treatment should be resolved in forthcoming years along with the evolution of validated biomarkers of ageing.

In conclusion, after only 1 year of treatment, it cannot be proposed that the hormesis theory is the most appropriate hypothesis to explain the effects observed in a non-human primate exposed to CR or RSV supplementation. CR and RSV might be two different stressors taking a different path to produce the same effects. Indeed, several differences were observed between CR and RSV supplementation, questioning the similarity of the pathways involved. If similar pathways between CR and RSV supplementation exist, as for example through sirtuins (especially SIRT1), it will be necessary to investigate the evolution of the levels of such molecules in future years of the RESTRIKAL project.

Acknowledgments The authors acknowledge the continuing assistance provided by Eric Gueton for daily feeding and care provided to animals. Laurine Haro is recognised for expert technical assistance. This work was carried out with the financial support of the French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

Allard JS, Perez E, Zou S, de Cabo R (2009) Dietary activators of Sirt1. Mol Cell Endocrinol 299(1):58–63

Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 423(6936):181–185

Anderson R, Prolla T (2009) PGC-1[alpha] in ageing and anti-ageing interventions. Biochim Biophys Acta 1790 (10):1059–1066

Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL (2007) Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. Toxicol Appl Pharmacol 224(3):274–283

Aujard F, Perret M (1998) Age-related effects on reproductive function and sexual competition in the male prosimian primate, *Microcebus murinus*. Physiol Behav 64(4):513–519

Aujard F, Dkhissi-Benyahya O, Fournier I, Claustrat B, Schilling A, Cooper HM, Perret M (2001) Artificially accelerated ageing by shortened photoperiod alters early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatonin excretion in a small primate, *Microcebus murinus*. Neurosci 105(2):403–412

Aujard F, Cayetanot F, Terrien J, Van Someren EJW (2007) Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate. Exp Gerontol 42(11):1079–1087

Aujard F, Bluet-Pajot MT, Zizzari P, Perret M, Epelbaum J (2010) Plasma IGF-1 level is a marker of individual life-span in a primate, the gray mouse lemur. Ageing Research 2:e1

Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA (2008) A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. PLoS One 3(6):e2264

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang MY, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 444(7117):337–342

Baur JA (2010) Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. Mech Ageing Dev 131(4):261–169

Berner YN, Stern F (2004) Energy restriction controls aging through neuroendocrine signal transduction. Ageing Res Rev 3(2):189–198

Berryman DE, Christiansen JS, Johannsson G, Thorner MO, Kopchick JJ (2008) Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models. Growth Horm IGF Res 18(6):455–471

Blanc S, Geloen A, Pachiaudi C, Gharib C, Normand S (2000) Validation of the doubly labelled water method in rats during isolation and simulated weightlessness. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279(6): R1964–R1979

Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J (2003) Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. J Clin Endocrinol Metab 88(1):16–23

Blanc S, Colman R, Kemnitz J, Weindruch R, Baum S, Ramsey J, Schoeller D (2005) Assessment of nutritional status in rhesus monkeys: comparison of dual-energy X-ray absorptiometry and stable isotope dilution. J Med Primatol 34 (3):130–138

Bordone L, Guarente L (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. Nature Rev Mol Cell Biol 6(4):298–305

Borra MT, Smith BC, Denu JM (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. J Biol Chem 280 (17):17187–17195

Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E (2008) Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. Biochem Biophys Res Commun 374(1): 117–122

Campbell BA, Richardson R (1988) Effect of chronic undernutrition on susceptibility to cold stress in young adult and aged rats. Mech Ageing Dev 44:193–202

Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. Nature 458(7241): 1056–1060

Cayetanot F, Van Someren EJW, Perret M, Aujard F (2005) Shortened seasonal photoperiodic cycles accelerate aging of the diurnal and circadian locomotor activity rhythms in a primate. J Biol Rhythms 20(5):461–469

Chen D, Guarente L (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. Trends Mol Med 13(2):64–71

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. Science 305 (5682):390–392

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science 325:201–204

Coward WA (1990) Calculation of pool sizes and flux rates. In: Prentice AM (ed) The doubly labelled water method: technical recommendations for use in humans. Report of an IDECG Expert Working Group, AERA, Vienna, Austria, Chapter 4

Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F (2010) Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. BMC Physiol (in press)

Dasgupta B, Milbrandt J (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (17):7217–7222

Delany JP, Hansen BC, Bodkin NL, Hannah J, Bray GA, Leibel RL (1999) Long-term calorie restriction reduces energy expenditure in aging monkeys. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 54:B5–B11

de Oliveira SL, Diniz DB, Amaya-Farfan J (2003) Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. Br J Nutr 89:89–96

Dhenain M, Chenu E, Hisley CK, Aujard F, Volk A (2003) Regional atrophy in the brain of lissencephalic mouse lemur primates: measurement by automatic histogram-based segmentation of MR images. Magn Reson Med 50(5):984–992

Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RHF, Ito K, Russell REK, Barnes PJ (2004) Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287(4):L774–L783

Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS (1996) Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. Arch Biochem Biophys 333:189–197

Gardner EM (2005) Caloric restriction decreases survival of aged mice in response to primary influenza infection. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 60(6):688–694

Génin F, Perret M (2000) Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. Physiol Behav 71 (3–4):315–321

Génin F, Perret M (2003) Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): effects of photoperiod and food restriction. Comp Biochem Physiol B 136(1):71–81

Gilbert C, Blanc S, Giroud S, Trabalon M, Le Maho Y, Perret M, Ancel A (2007) Role of huddling on the energetic of growth in a newborn altricial mammal. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293(2):R867–R876

Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, Perret M (2008a) Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294:R1958–R1967

Giroud S, Perret M, Le Maho Y, Momken I, Gilbert C, Blanc S (2008b) Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the grey mouse lemur. J Comp Physiol B 179(1):99–111

Giroud S, Perret M, Stein P, Goudable J, Aujard F, Gilbert C, Robin JP, Le Maho Y, Zahariev A, Blanc S, Momken I (2010) The grey mouse lemur uses season-dependent fat or protein sparing strategies to face chronic food restriction. PLoS One 5(1):e8823

Gredilla P, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G (2001) Caloric restriction decreases mitochondrial generation at complex 1 and lowers oxidative damage. FASEB J 15:1589–1591

Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic

adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. J Am Med Assoc 295 (21):2482–2482

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 425(6954):191–196

Huffman DM, Moellering DR, Grizzle WE, Stockard CR, Johnson MS, Nagy TR (2008) Effect of exercise and calorie restriction on biomarkers of aging in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294(5):R1618–R1627

Iannelli P, Zarrilli V, Varricchio E, Tramontano D, Mancini FP (2007) The dietary antioxidant resveratrol affects redox changes of PPAR[alpha] activity. Nutr Metab Cardiovasc Dis 17(4):247–256

Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, Renquist DM, Knapka JJ, April M, Belcher CT, Clark MA, Hatcherson CD, Marriott BM (1990) Dietary restriction and ageing: the initiation of a primate study. J Gerontol 45(5):B148–B163

Ingram DK, Chefer S, Matochik J, Moscrip TD, Weed J, Roth GS, London ED, Lane MA (2001) Aging and caloric restriction in nonhuman primates: behavioral and in vivo brain imaging studies. Ann N Y Acad Sci 928:316–326

Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, de Cabo R, Mattison JA (2006) The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. Biogerontology 7(3):143–148

Ingram DK, Young J, Mattison JA (2007) Calorie restriction in nonhuman primates: assessing effects on brain and behavioral ageing. Neurosc 145(4):1359–1364

Kemnitz JW, Weindruch R, Roecker EB, Crawford K, Kaufman PL, Ershler WB (1993) Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: design, methodology, and preliminary findings from the first year of study. J Gerontol 48(1): B17–B26

Kraska A, Dorieux O, Picq JL, Petit F, Bourrin E, Chenu E, Volk A, Perret M, Hantraye P, Mestre-Frances N, Aujard F, Dhenain M (2009) Age-associated cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiol Aging (in press)

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 [alpha]. Cell 127(6):1109–1122

Lane MA, Ingram DK, Cutler RG, Knapka JJ, Barnard DE, Roth GS (1992) Dietary restriction in nonhuman primates: progress report on the NIA study. Ann N Y Acad Sci 673:36–45

Lane MA, Tilmont EM, De Angelis H, Handy A, Ingram DK, Kemnitz JW, Roth GS (2000) Short-term calorie restriction improves disease-related markers in older male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Mech Ageing Dev 112 (3):185–196

Lane MA, Mattison J, Ingram DK, Roth GS (2002) Caloric restriction and ageing in primates: Relevance to humans and possible CR mimetics. Microsc Res Tech 59(4): 335–338

Lee EJ, Kim KR, Lee HC, Cho JH, Nam MS, Nam SY, Song YD, Lim SK, Huh KB (1995) Acipimox potentiates growth hormone response to growth hormone releasing hormone by decreasing serum free fatty acid levels in hyperthyroidism. Metabolism 44(11):1509–1512

Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. Science 285:1390–1393

Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and Sir2 for life-span extension by caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. Science 289:2126–2128

Martin B, Pearson M, Kebejian L, Golden E, Keselman A, Bender M, Carlson O, Egan J, Ladenheim B, Cadet JL, Becker KG, Wood W, Duffy K, Vinayakumar P, Maudsley S, Mattson MP (2007) Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. Endocrinology 148(9):4318–4333

Masoro EJ (2006) Role of hormesis in life extension by caloric restriction. Dose Response 5(2):163–173

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. J Nutr 10(1):63–79

Meites J (1989) Evidence that underfeeding acts via the neuroendocrine system to influence ageing processes. Prog Clin Biol Res 287:169–180

Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL (2004) Actual causes of death in the United States. J Am Med Assoc 291(10):1238–1245

Moscrip TD, Ingram DK, Lane MA, Roth GS, Weed JL (2000) Locomotor activity in female rhesus monkeys: assessment of age and calorie restriction effects. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 55(8):B373–B380

Nam SY, Lee EJ, Kim KR, Cha BS, Song YD, Lim SK, Lee HC, Huh KB (1997) Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-1, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. Int J Obes 21:355–359

Nemoz-Bertholet F, Menaker M, Aujard F (2004) Are age-related deficits in balance performance mediated by time of day in a prosimian primate (*Microcebus murinus*)? Exp Gerontol 39(5):841–848

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metab 8(2):157–168

Perret M (1985) Diurnal variations in plasma testosterone concentrations in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). J Reprod Fertil 74(1):205–213

Perret M, Aujard F (2001) Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(6):R1925–1933

Perret M, Aujard F (2005) Ageing and season affect plasma dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels in a primate. Exp Gerontol 40(7):582–587

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-[gamma]. Nature 429(6993):771–776

Picq JL (2007) Ageing affects executive functions and memory in mouse lemur primates. Exp Gerontol 42(3):223–232

Racette SB, Schoeller DA, Luke AH, Shay K, Hnilicka J, Kushner RF (1994) Relative dilution spaces of 2H and 18 O-labelled water in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 30:E585–E590

Raman A, Ramsey JJ, Kemnitz JW, Baum ST, Newton W, Colman RJ, Weindruch R, Beasley MT, Schoeller DA (2007) Influences of calorie restriction and age on energy expenditure in the rhesus monkey. Am J Physiol Endocrinol Metab 292:E101–E106

Ramsey JJ, Roecker EB, Weindruch R, Baum ST, Kemnitz JW (1996) Thermogenesis of adult male rhesus monkeys: results through 66 months of dietary restriction. FASEB J 10:A726

Rattan SIS (2004) Aging, anti-aging, and hormesis. Mech Ageing Dev 125:285–287

Redman LM, Ravussin E (2009) Endocrine alterations in response to calorie restriction in humans. Mol Cell Endocrinol 299(1):129–136

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1[alpha] and SIRT1. Nature 434 (7029):113–118

Séguy M, Perret M (2005) Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*). J Comp Physiol B 175(2):107–115

Shanmuganayagam D, Warner TF, Krueger CG, Reed JD, Folts JD (2007) Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. Atherosclerosis 190(1):135–142

Shimokawa I, Higami Y (2001) Leptin and anti-ageing action of caloric restriction. J Nutr Health Ageing 5:43–48

Smith SR (1996) The Endocrinology of Obesity. In: Bray G (ed) Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. WB Saunders, Philadelphia, pp 921–942

Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H (1994) Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. Mech Ageing Dev 76:215–224

Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. Proc Nat Acad Sci USA 105(9):3438–3442

Terrien J, Zizzari P, Epelbaum J, Perret M, Aujard F (2009a) Daily rhythms of core temperature and locomotor activity indicate different adaptive strategies to cold exposure in adult and aged mouse lemurs acclimated to a summer-like photoperiod. Chronobiol Int 26(5):838–853

Terrien J, Zahariev A, Blanc S, Aujard F (2009b) Impaired control of body cooling during heterothermia represents the major energetic constraint in an aging non-human primate exposed to cold. PLoS One 4(10):e7587, 1–9

Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Nature 410:227–230

Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current Biol 16(3):296–300

Veldhuis JD, Erickson D, Iranmanesh A, Miles JM, Bowers CY (2005) Sex-steroid control of the ageing somatotropic axis. Endocrinol Metab Clin North Am 34:877–893, viii

Wakeling L, Ions L, Ford D (2009) Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? AGE 31(4):327–341

Weed JL, Lane MA, Roth GS, Speer DL, Ingram DK (1997) Activity measures in rhesus monkeys on long-term calorie restriction. Physiol Behav 62(1):97–103

Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS, Spindler SR (2001) Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56(1):20–33

Weir JB (1949) New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. J Physiol 109:1–9

Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. Proc Nat Acad Sci USA 106(4):1255–1260

Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature 430(7000): 686–689

Zainal TA, Oberley TD, Allison DB, Szweda LI, Weindruch R (2000) Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. FASEB J 14:1825–1836

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Cognitive Performances Are Selectively Enhanced during Chronic Caloric Restriction or Resveratrol Supplementation in a Primate

Alexandre Dal-Pan[1☯], Fabien Pifferi[1☯], Julia Marchal[1], Jean-Luc Picq[2], Fabienne Aujard[1]*, on behalf of RESTRIKAL Consortium[¶]

1 Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France, **2** Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, Université Paris 08, St Denis, France

Abstract

Effects of an 18-month treatment with a moderate, chronic caloric restriction (CR) or an oral supplementation with resveratrol (RSV), a potential CR mimetic, on cognitive and motor performances were studied in non-human primates, grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). Thirty-three adult male mouse lemurs were assigned to three different groups: a control (CTL) group fed *ad libitum*, a CR group fed 70% of the CTL caloric intake, and an RSV group (RSV supplementation of 200 $mg.kg^{-1}.day^{-1}$) fed *ad libitum*. Three different cognitive tests, two motor tests, one emotional test and an analysis of cortisol level were performed in each group. Compared to CTL animals, CR or RSV animals did not show any change in motor performances evaluated by rotarod and jump tests, but an increase in spontaneous locomotor activity was observed in both groups. Working memory was improved by both treatments in the spontaneous alternation task. Despite a trend for CR group, only RSV supplementation increased spatial memory performances in the circular platform task. Finally, none of these treatments induced additional stress to the animals as reflected by similar results in the open field test and cortisol analyses compared to CTL animals. The present data provided the earliest evidence for a beneficial effect of CR or RSV supplementation on specific cognitive functions in a primate. Taken together, these results suggest that RSV could be a good candidate to mimic long-term CR effects and support the growing evidences that nutritional interventions can have beneficial effects on brain functions even in adults.

Citation: Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, Picq J-L, Aujard F, et al. (2011) Cognitive Performances Are Selectively Enhanced during Chronic Caloric Restriction or Resveratrol Supplementation in a Primate. PLoS ONE 6(1): e16581. doi:10.1371/journal.pone.0016581

Editor: Georges Chapouthier, Université Pierre et Marie Curie, France

Received December 8, 2010; **Accepted** January 6, 2011; **Published** January 31, 2011

Copyright: © 2011 Dal-Pan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was carried out with the financial support of The French National Research Agency (project ANR-06-PNRA-010-01) and the Foundation for French Medical Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aujard@mnhn.fr

☯ These authors contributed equally to this work.

¶ Membership of the RESTRIKAL Consortium is provided in the Acknowledgments.

Introduction

With the increase of human longevity have appeared a significant number of age-related diseases and more particularly, age-related brain dysfunctions. Thus, a growing interest for non-genetic anti-aging strategies development as food protocols is revealed. Caloric restriction (CR) is the only non-genetic manipulation known to increase longevity and delay age-related diseases in various species, including mammals (see [1] for review). Interestingly, CR protocol was able to improve memory performances in healthy elderly humans [2]. However, given that CR is difficult to implement in humans due to social and practical constraints, development of CR mimetic compounds might be a suitable alternative. In the last five years, numerous studies focused on the development of these CR mimetic compounds [3,4,5,6]. Among them, resveratrol (RSV), a natural polyphenolic compound that activates proteins implicated in energy metabolism homeostasis, seems to be a promising anti-aging molecule [7,8,9,10,11] which could slow brain functions decline with age.

Many studies have focused on long-term effects of CR in rodents but few data are available about RSV effects. CR treatments were mainly initiated early in the life of the animal (young or adult age) to observe the effects at a later age. It was demonstrated that CR started at mid-life in adult mice allowed to preserve strength, coordination and spontaneous alternation behaviour when the mice began to age [12]. Conversely, some studies in rats reported that CR protocol began at young age failed to provide protection against deficits in cognitive tasks in aged animals [13]. Yanai et al. demonstrated that CR has even negative effects on cognitive performance in a spatial discrimination task in aged rats submitted to moderate CR throughout their life [14]. A possible cause of such a cognitive decline was the lower availability of energy substrates to the brain [14]. In monkeys (*Macaca mulatta*), preliminary results demonstrated that aged primates exhibited a reduction of age-related diseases and brain atrophy after several years of CR [5,15]. However, its impact on cognitive functions remains unknown in this non-human primate. Moreover, these results were observed in aged monkeys but response in adults remains unknown. Several other studies have been developed directly in older individuals to assess the short-term effects of CR on cognitive performances. Witte et al. demonstrated in elderly

Human volunteers that a 3-month moderate CR induced a significant increase of 20% in verbal memory scores, which was correlated with decreases in fasting plasma levels of insulin [2]. Moreover, a 10-day CR in 24-month old rats can suppress age-related increase in oxidative stress and inflammatory process, two major causes of brain dysfunctions [16]. To our knowledge, only one study demonstrated that adult rodents subjected to a 6-month diet restriction protocol presented better learning and consolidation processes [17] and no study implemented in a nonhuman primate has demonstrated the effects of long-term CR in adult animals. Several studies have demonstrated the role of RSV in maintaining neuronal function in rodents (see [18] for review). RSV was able to prevent cognitive impairment in rat submitted to artificial treatments inducing Parkinson's disease [19], diabetes [20], neuroinflammation [21], head injuries [22] or in the case of transgenic rodent models of Alzheimer's disease [23]. To our knowledge, only one study on a fish showed a protective effect of RSV against cognitive decline due to natural aging [24]. However, rigorous assessments of RSV effects on normal cognitive function in adult nonhuman primates remained to be performed.

One originality of the present study lies on the animal model, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) which is a nocturnal prosimian primate originating from Madagascar with a life expectancy of 8–10 years. The grey mouse lemur presents specific characteristics for a primate that makes it a unique model to assess the effects of CR or RSV treatments on a non-human primate organism. Besides practical aspects related to its small size (around 15 cm without tail) and its low body mass (80 to 120 g), the mouse lemur has the ability to make energy reserve once a year during the winter season thanks to important fattening process [25,26]. Furthermore, this animal presents a daily hypothermia phase allowing to adjust the energy reserves in accordance with environment constraints [27,28]. Previous study has already shown that CR or RSV supplementation modified the regulation of energy balance in mouse lemur [29] but no data was provided about the effects of these treatments on cognitive performances of these animals. Yet, comparable to what is observed in humans, cognitive impairments [30] and MRI-evaluated cerebral atrophy [31,32] were demonstrated in this primate. We can hypothesize that CR or RSV supplementation would improve the cognitive functions of adult mouse lemurs after several months of treatment.

In the present study, we assessed the effects of a moderate chronic CR or RSV supplementation, initiated at adult age (38±2 months), on cognitive and motor functions in mouse lemur. We used three different tasks: (i) the continuous spontaneous alternation (CSA) task which involves working memory managed by striato-prefrontal circuits, (ii) the circular platform (CP) task which requires hippocampal system-dependent spatial memory and (iii) the conditioned place preference (CPP) task which assesses emotional memory mediated by the amygdala. Three criterions were considered for selecting these cognitive tests: (i) age-related impairment on these tests has been reported in various species [33,34,35], (ii) the different tests presumably tax different cognitive capacities subserved by different cerebral structures [36] and, (iii) no food reinforcement is required and, consequently, motivation to achieve these tasks is independent of diet. Besides cognitive functions, motor abilities were evaluated using the Rotarod test and a jump test completed with spontaneous locomotor activity measurements. Emotionality was assessed using the open field task. In order to evaluate the impact of both treatments on stress, urinary cortisol level was also assessed. Physical fitness and emotionality were measured as to make sure that differences in performance on cognitive tasks did not rely on non-cognitive functions.

The objective of our study was to evaluate and to compare, for the first time, the impact of a chronic and moderate CR or mimetic compound (RSV) supplementation on cognition and motor performances in adult primates. We expect better cognitive and motor performances of CR group compared to control group after 18 months of treatment. Moreover, we hypothesize that RSV supplementation will mimic observed CR effects by improving cognitive and motor functions of grey mouse lemurs. These issues are of major importance in the validation and implementation of such long term protocols in humans.

Materials and methods

1 Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the *Principles of Laboratory Animal Care* (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). The Research was conducted under the authorization n° 91–305 from the "Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Essonne" and the Internal Review Board of the UMR 7179. All the experiments were done under personal license (authorization number 91–460, issued 5 June, 2009) delivered by the Ministry of Education and Science. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research", special attention was paid to the welfare of animals during this work [37]. All efforts were made to minimize nociception.

2 Subjects and dietary interventions

All the male grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Cheirogaleidae, primates) used in this study were part of the Restrikal study described previously [29]. In the breeding colony, animals are exposed to an artificial photoperiodic regimen consisting of six months of summer-like long day length (14:10 h light-darkness) and six months of winter-like short day length (10:14 h light-darkness). Analysis of survival from 254 male mouse lemurs from the captive colony allowed to determine the mean life span (72±2 months), the mean life span of the 10% of the most long lived animals (120±2 months) and the observed maximal survival duration (144 months which corresponds to 12 years). Thirty-three animals were used. Animals were included at the age of 38±2 months, at the onset of their winter-like season (short days, SD). Animals were weighed at the beginning of the experiment (87±3 g) and during each test session to monitor body mass variations.

Dietary protocol of the Restrikal study has already been described [29]. Briefly, animals were fed with fresh fruit and a daily mixture made up of cereals, milk and egg. Water was always given *ad libitum*. Animals were randomly assigned to each experimental group. Three different groups were formed: an *ad libitum* control group (CTL) of 11 animals, a CR group of 10 animals which was fed with the same diet but received 30% less than CTL and, a third RSV group of 12 animals which was fed with the same quantity of food as CTL but supplemented with 200 mg of RSV per kilogram body weight per day (Sequoia Research Products, United Kingdom). In order to know the exact quantity of food ingested by the animals, daily leftover were measured and corrected for water evaporation.

Cognitive and motor tests were performed at the end of the SD period because it corresponds to one of the most important active phases in grey mouse lemur. All tests were realized during the last 6 hours before their daily active phase. Thereby, cognitive tests were performed after 18 months of treatment (animals were 56±2 months) and the animals presented a mean body mass of 126±26 g for CTL, 112±30 g for CR and 129±30 g for RSV.

No statistical difference was observed for the mean body mass between groups (CTL vs CR, $U = 47.5$, $p = 0.597$ and, CTL vs RSV, $U = 59$, $p = 0.667$).

3 Continuous spontaneous alternation (CSA) task

3.1 Apparatus. The test was performed in a plus-maze constructed of wood (each arm: 25 cm high×40 cm long×15 cm wide). The maze rested on papers that were changed between trials. The four arms (labelled A, B, C and D) ended with 90° left turns (10 cm long). Thus, the ends of the arms were not visible from the centre of maze and, as a consequence, had incentive effect on mouse lemur exploratory behaviour. In order to avoid jumps over the walls of the maze, a one-way mirror covered the top of the maze. This ceiling permitted observation by experimenter but prevented mouse lemurs from seeing extramaze cues. Different intramaze cues such as pieces of plastic, foam rubber or cardboard were placed on the walls of each arm in order to differentiate them. A red 15 W bulb was placed halfway on the top of the longer wall of each arm and provided the only light in the room during testing.

3.2 Testing procedure. At the beginning of the trial, the animal was placed in the centre of the maze with all the four alleys shut off by opaque doors. After 30 seconds, the doors were slowly raised and the mouse lemur was allowed to explore freely the four arms for 20 minutes. The number and the sequence of entries (all four paws into a given arm) were recorded. The latency before the first entry was also noted (expressed in sec). Partial alternation was defined as entry into three different arms on the same overlapping sets of four consecutive choices. Total alternation was defined as entry into four different arms on the same overlapping sets of four consecutive choices. For example, a set consisting of arm choices B, D, C, B, was considered an alternation. The possible alternation sequences are equal to the number of arms entries minus three. The percent alternation is equal to the ratio of (actual alternation/possible alternation) X 100. Values were expressed as percentage. Only data from animals that made at least 6 arm entries were included in the behavioural analyses. $N = 6$ CTL, $n = 6$ CR and $n = 9$ RSV animals succeeded this test.

4 Circular platform (CP) task

4.1 Apparatus. The CP task apparatus was an adaptation for mouse lemurs of the device described by Barnes [38]. It consisted of a white circular platform (diameter, 100 cm) with 12 equally spaced circular holes (each 5 cm in diameter) located 3 cm from the perimeter. The platform could be rotated. The maze platform was affixed 60 cm above the floor, and a cardboard nestbox (10 cm×10 cm×20 cm) could be inserted and removed beneath each hole and served as a refuge (goal box). A black, small plywood box could be slid beneath the non-goal holes to stop the lemurs from jumping through these holes while permitting head entering. To prevent the mouse lemur from escaping, the platform was entirely surrounded with a white wall 25 cm high across its circumference and covered with a transparent Plexiglas® ceiling that permitted the mouse lemurs to see the extra-maze visual cues. The apparatus was surrounded by a black curtain hung from a square metallic frame (length of the side, 120 cm) located 110 cm above the floor. The center of the frame was a one-way mirror to allow observation. Affixed beneath the one-way mirror and following the circular perimeter of the maze (about 50 cm above the platform) were 24 2-W lights evenly spaced, illuminating the maze. Between the one-way mirror and the upper edge of the wall, various objects were attached along the inner surface of the curtain to serve as visual cues. The starting box was an open-ended dark cylinder positioned in the center of the platform. Transparent radial Plexiglas partitions (25 cm high×20 cm long) were placed between the holes to prevent the strategy used by some mouse lemurs to go directly to the periphery of the platform and then walk along the barrier wall and inspect each hole one by one. Consequently, animals had to return to the center of the platform after each hole inspection.

4.2 Testing procedure. Animals were given one day of habituation and training (day 1) and one day of testing (day 2). Each day comprised four trials, each of which began with placement of the animal inside the starting box. After 30 seconds, the box was lifted to release the animal. For the lemurs, the objective was to reach the goal box positioned beneath one of the 12 holes, kept constant in the room for all trials. When the animal entered the goal box, the trial was stopped, and the animal was allowed to remain in the goal box for 3 minutes. After each trial, the platform was cleaned and randomly rotated on its central axis to avoid the use of intra-maze cues, although the position of the goal box was kept constant in the room.

On day 1, trials 1 and 2 consisted of placing the animal in a four-walled chamber containing only the opened goal hole (one-choice test). For trials 3 and 4, the platform comprised six evenly spaced open holes (six-choices test). These two trials permitted the animal to explore the maze, observe the visual cues, and further learn the position of the goal box.

On day 2 (testing day), 12 holes were opened during the four trials. Performance was assessed by the time required for the animal to reach the right exit (expressed in sec) and the number of errors prior to reaching the goal box. An error was defined as an inspection made by inserting the nose into an incorrect hole. Thus, values were expressed in error numbers. Only data from animals that reached the goal box before 30 min of testing were included in the behavioural analyses. $N = 8$ CTL, $n = 9$ CR and $n = 8$ RSV animals succeeded this test.

5 Conditioned place preference (CPP) task

5.1 Apparatus. The apparatus designed for the CPP task consisted of two chambers made of wood and that differed in shape and in wall and floor covering (foam rubber, newspapers, cardboard, plastic, etc.). One chamber was rectangular (33 cm long×26 cm wide×20 cm high) and the other was triangular (35 cm base×45 cm depth×20 cm high). Each chamber was lit by a red 15 w bulb. A small window made of one-way mirror was inserted in the ceiling of each chamber providing the experimenter the inside view of the chamber. During pre-exposure and preference phases, the two chambers were connected by a transparent Plexiglas cylinder (30 cm long×10 cm diameter). The entire apparatus was placed on a wood table 100 cm above the floor. A red 15 w bulb was placed 30 cm above the Plexiglas cylinder enabling the mouse lemur to see the outside and to be visible from the outside. This relied on the natural tendency of mouse lemurs to avoid open spaces and prevented the mouse lemur from staying too long into it.

5.2 Testing procedure. The test took place over six consecutive days and consisted of three discrete phases: (i) pre-exposure phase, (ii) conditioning phase, (iii) test phase.

On pre-exposure phase (day 1), the animal was placed inside the cylinder and thereafter the cylinder was fixed between the two chambers. After 30 seconds, the sliding doors that blocked the ends of the cylinder were removed, allowing the animal to freely access to both chambers for a 15-min period. This exploration period started when the mouse lemur entered a chamber. Time spent in each of the two chambers was recorded. Animal was considered to be in a chamber when both its four paws were in it. No reinforcing stimulus was associated with either of the chambers during this phase. This phase provided the mouse lemur with some

experience of both contexts and enabled the experimenter to determine which are the preferred and the non-preferred chamber for each animal. The preferred chamber was determined as the chamber in which the animal stayed at least twice the time compared to the other chamber.

On conditioning phase (days 2–5) mouse lemurs were confined to each chamber on alternate days for a 30-min session. During the days 2 and 4, each animal was placed inside its preferred chamber. Aversive stimuli associated with this chamber were a white bright light and a brief shaking of the chamber at 5^{th}, 15^{th} and 25^{th} minute. This chamber was referred to as the negative paired chamber. During the days 3 and 5, each animal was placed inside its non-preferred chamber. The rewarding stimuli associated with this chamber were a dim red light and, after 15 minutes, the introduction of the own nest box of each animal. This chamber was referred to as the positive paired chamber.

On test phase (day 6), each mouse lemur was given free access to both chambers for a 15-min period and the time spent in each chamber was recorded, in a similar way to that used during the pre-exposure phase. Thus, we could estimate the percentage of reversal by subtracting the percentage of time spent in the preferred chamber by the animal on day 6 to those obtained in day 1. Values were expressed in percentage. Only data from animals for which we could determine a preferred chamber during day 1 were included in the behavioural analyses. N = 8 CTL, n = 8 CR and n = 9 RSV animals succeeded this test.

6 Open field task

6.1 Apparatus. This system was an open-field consisting of bright and opaque Plexiglas® wall (100×100×20 cm) and covered with a transparent Plexiglas® ceiling. Four white lights of 15 W were placed at each corner of the system. The open field session was recorded by camera and the data were analyzed after the session, which avoided the presence of an observer in the room during the test.

6.2 Testing procedure. The mouse lemurs were placed in an open-field for free exploration for 30 min. At the end of the session, the nestbox of the mouse lemur was placed in a corner of the open field (the same corner for all animals) to allow him to return to its nestbox with a minimal stress.

Because of persistent immobility, peripheral tracking and limited exploration are index of stress and anxiety in mouse lemurs when placed in a novel environment. We determined two parameters reflecting the degree of emotionality for each animal: (i) latency of the first movement to explore the field (expressed in sec) and (ii) total distance performed by the animals (expressed in cm). Data from animals that did not move during the 30 minutes of the experiment were excluded of the behavioural analyses. N = 9 CTL, n = 9 CR and n = 10 RSV animals succeeded this test.

7 Accelerating rotarod task

7.1 Apparatus. This apparatus allowed quantification of fine motor coordination and balance by measuring with a chronometer, the amount of time that a mouse lemur could remain standing on a rotating, accelerating rod (model 7750, Ugo Basile, Italy). The rod was a plastic drum, 5 cm in diameter, which was machined to provide traction. The rotational speed of the system could progressively increase to up to 40 rpm.

7.2 Testing procedure. The animal was placed on the rotating cylinder at 20 rpm. The rod then accelerated steadily until the end of the test which was reached when the animal fell or gripped on the rod during at least three consecutive turns without stabilizing its balance. Latency to fall or grip on the rod was recorded for each trial. Animals underwent 5 consecutive trials and the best result was recorded. Values were expressed in seconds. The system was cleaned between each trial. Data from animals that jumped from the apparatus were excluded of the behavioural analyses. N = 7 CTL, n = 9 CR and n = 8 RSV animals succeeded this test.

8 Jump task

8.1 Apparatus. The test was performed in a closed chamber of wood (200 cm high×50 cm long×50 cm wide). The apparatus was affixed 30 cm above the floor. A one-way mirror covered one side of the closed chamber that permitted observation by experimenter without disturbing mouse lemurs. In the close chamber, an adjustable metal rod was installed that allowed to progressively increase the height of this rod of 10 cm between each effective test. A hatch located at the base allowed to introduce the animal in the closed chamber. To motivate the animal to jump, a 20 W bulb was placed below the system and its nestbox was installed 10 cm above the metal rod.

8.2 Testing procedure. The animal was introduced in the closed chamber for a test of maximum 5 minutes. For the first trial, the metal rod was placed at a height of 20 cm. When the animal succeeded to rejoin its nestbox, the trial was stopped, and the animal was allowed to remain in its nestbox for 1 min. The height of the metal rod was raised by 10 cm between each successful trial. If the animal did not reach its nestbox after 5 minutes, the test was stopped and the animal was manually removed from the apparatus. The maximum height (cm) reached by the mouse lemur was noted. The system was cleaned between each trial. Data from animals that did not jump after 5 min were excluded of the behavioural analyses. N = 9 CTL, n = 11 CR and n = 10 RSV animals succeeded this test.

9 Spontaneous locomotor activity

Animals were housed individually in a laboratory-made locomotor activity cage with a capacity of 1 m^3 each provided with nest and supports. Spontaneous locomotor activity was estimated using a system of presence and motion sensors placed in the cage and the nest created by R. Botalla and adapted to the mouse lemur. Presence sensors (Honeywell – transmitter: SEP8705003, receiver: SDP8405014) were placed on both sides of the nest and were continuously recording in order to detect animal presence in the nest. Two motion sensors (GARDTEC – Gardscan 'M' series infra-red detectors) were placed in the corners of the cage to detect the spontaneous movements of the animal. During animal movements the motion sensors recorded data every two seconds. Data were stored in a computerized system (developed in the laboratory by R. Botalla). They were then computed to represent time-course of these movement patterns using a software filtering "ACTOCEBE 3.0" developed in language G from National Instruments (software created by R. Botalla). Based on animal activity, total movements were averaged on 5 minutes intervals for further analysis and were expressed in arbitrary unit (a.u.). In the present study we focused on night locomotor activity (mean locomotor activity during the night) which is the active period of Grey mouse lemurs. Spontaneous locomotor activity was measured during 14 consecutive days for each animal. N = 7 CTL, n = 6 CR and n = 7 RSV supplemented animals were submitted to the locomotor activity measurement.

10 Urinary cortisol level assessment

To avoid the handling stress during urinary cortisol assessment, urine samples were collected overnight using a urine collector with ice placed below the cage of the animals. Urine samples were stored at −20°C until assayed. Urinary cortisol concentrations were measured twice on 10 µl of urine by an immunoenzymoassay (Demeditec Diagnostics, Germany). The minimum detectable cortisol concentration was 10 ng/ml. The mean intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.8% and 7.4%, respectively.

To control the variation in volumes and concentrations of the voided urine, the creatinine (Cr) content of each urinary sample was determined with a Cr colorimetric test (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA). Urinary cortisol concentrations were expressed as microgram per gram of Cr.

11 Data analyses

All values are expressed as mean ± SEM. Only animals that succeeded a test were taken into account in our analyses, what explained the different numbers of animals followed in the tests. The mean failure rate was 22±3% and was independent of treatment. Mann-Whitney U test was used to assert significant variations between the CTL group and CR or RSV supplemented animals in all studied parameters. Spearman correlation analyses were performed to determine the degree and direction of association between body mass and physical performances of the animals. Comparisons were considered to differ significantly when $p<0.05$. All statistical computations were performed with SYSTAT for Windows (V9, SPSS Inc., USA).

Results

1 CSA task

No significant effect of both treatments was found for the latency of first movement in the CSA task which averaged 73±20 s (CTL vs CR, U = 28, p = 0.581; CTL vs RSV, U = 33.5, p = 0.856). Similarly, no significant difference appeared between the three groups for the number of corridors visited with an average of 18±3 corridors in each group (CTL vs CR, U = 63, p = 0.323; CTL vs RSV, U = 29.5, p = 0.074). No significant effect was observed between CR *vs* CTL (68±16% and 57±10%, respectively, U = 23.5, p = 0.377) and RSV *vs* CTL (78±7% and 57±10%, respectively, U = 14.5, p = 0.140) for partial alternation (Fig. 1A). Total alternation is very low in the CTL group (3±3%) and was significantly higher in CR animals (22±7% of total alternation) compared to CTL (U = 30.5, p = 0.033). Similarly, RSV fed animals had significantly higher total alternation (22±5%) compared to CTL animals (U = 9, p = 0.025, Fig. 1B).

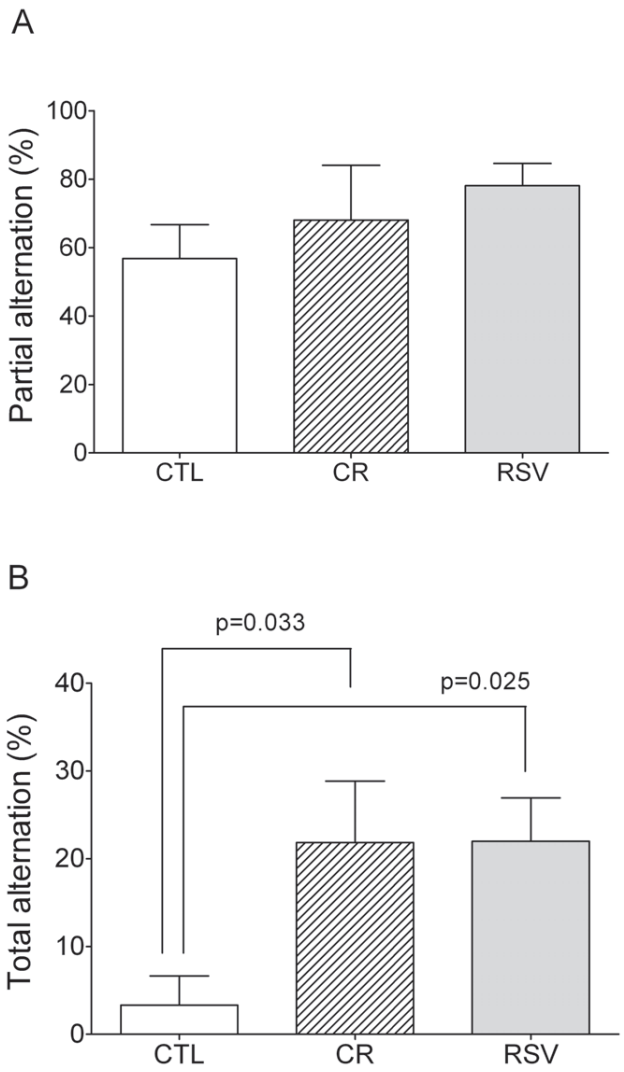


Figure 1. Effects of CR and RSV treatments on cognitive performances in a continuous spontaneous alternation (CSA) task. Figure 1A and B respectively represents the partial and total alternation (%) in the CSA task of control (CTL, n = 6), caloric restricted (CR, n = 6) or resveratrol supplemented (RSV, n = 9) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions. Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g001

2 CP task

No significant treatment effect was observed concerning the time required for the animals to reach the exit in the CP task (Fig. 2A, CTL vs CR, U = 51.5, p = 0.910; CTL vs RSV, U = 58; p = 0.895) which averaged 480±68 s. RSV supplementation had a significant effect on the number of errors made in CP task compared to CTL animals (3±1 errors in RSV supplemented animals, 5±1 in CTL animals, U = 91, p = 0.041). No significant effect of CR was observed (4±1 errors, U = 29.5, p = 0.120) (Fig. 2B).

3 CPP task

CPP performance expressed as the percentage of reversal (Fig. 3) was 55±11% in CTL animals and was not significantly different in CR (74±13%, U = 42, p = 0.249) and RSV supplemented animals (55±12%, U = 39.5, p = 0.929).

4 OF task

No significant difference was found between CR *vs* CTL (448±159 s and 302±193 s, U = 54, p = 0.943) and RSV *vs* CTL (87±41 s and 302±193 s, U = 64, p = 0.901) for the latency of first movement which averaged 272±84 s (Fig. 4A). Similar results were obtained for the total distance travelled by the animals in OF task with no significant difference between CR *vs* CTL (3469±2117 cm and 1911±1261 cm, U = 68, p = 0.359) and RSV *vs* CTL (3084±2974 cm and 1911±1261 cm, U = 75, p = 0.579) (Fig. 4B, mean = 2831±1238 cm).

5 Rotarod task, jump task and spontaneous night locomotor activity

No significant difference was found between CR *vs* CTL (U = 30.5, p = 0.875) and RSV *vs* CTL (U = 30.5, p = 0.875) for the physical performances in the rotarod task (Fig. 5A, mean = 43.4±9.5 s) In the same way, no significant difference was observed between CR *vs* CTL (U = 56.5, p = 0.603) and RSV *vs* CTL (U = 39.5, p = 0.401) for the physical performances in the jump task (Fig. 5B, mean = 35.0±1.7 cm). Moreover, no correlation appeared between Rotarod or jump performances and body mass of mouse lemurs ($r=-0.475$, $n=24$, NS, and $r=-0.132$, $n=30$, NS, respectively). CR animals exhibited a significantly higher night locomotor activity (21.5±0.6 a.u.) compared

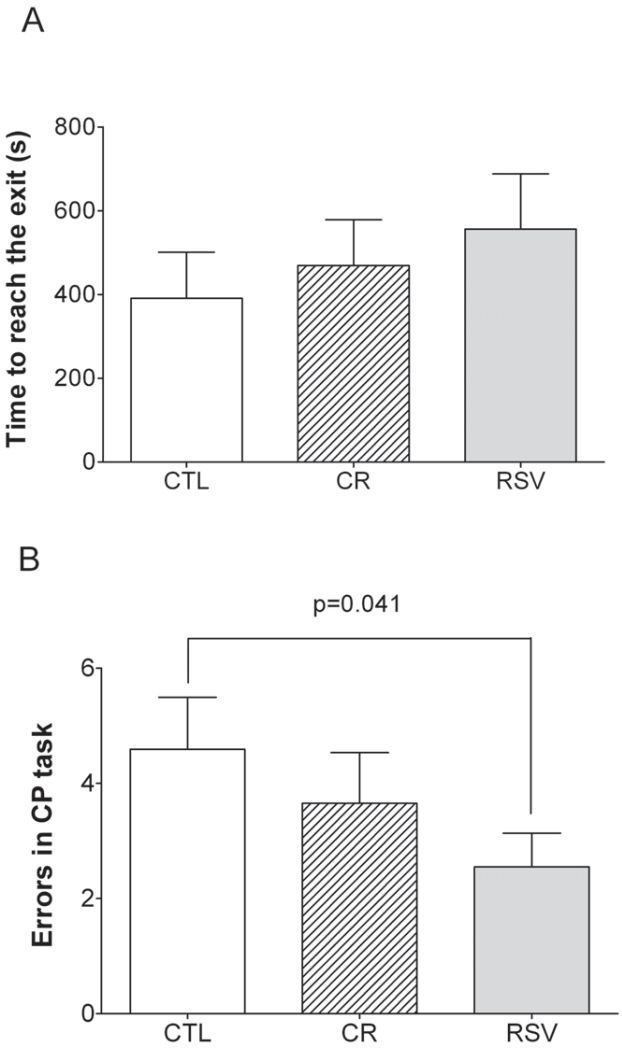


Figure 2. Effects of CR and RSV treatments on cognitive performances in a circular platform (CP) task. Figure 2A and 2B respectively represent the time (expressed in sec) to reach the exit and the number of errors before succeeding to find the exit of control (CTL, n = 8), caloric restricted (CR, n = 9) or resveratrol supplemented (RSV, n = 8) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions. Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g002

to CTL (15.7±0.3 a.u.) (U = 34, p = 0.043). RSV supplemented animals also had a significantly higher night locomotor activity (18.7±0.4 a.u., U = 13, p = 0.042) compared to CTL animals.

6 Urinary cortisol level

The assessment of urinary cortisol level revealed no significant difference between CR *vs* CTL (U = 44, p = 0.935) and RSV *vs* CTL (U = 40, p = 0.470) (Fig. 6). Urinary cortisol level was 611±143 ng/mg of creatinine in CTL animals and 507±63 and 667±111 ng/mg of creatinine in the CR and RSV supplemented animals, respectively.

Discussion

A cohort of adult grey mouse lemurs was followed in order to evaluate their cognitive and motor performances as well as their emotionality after 18 months of chronic moderate CR or RSV supplementation. Regarding the impact of CR on behaviour,

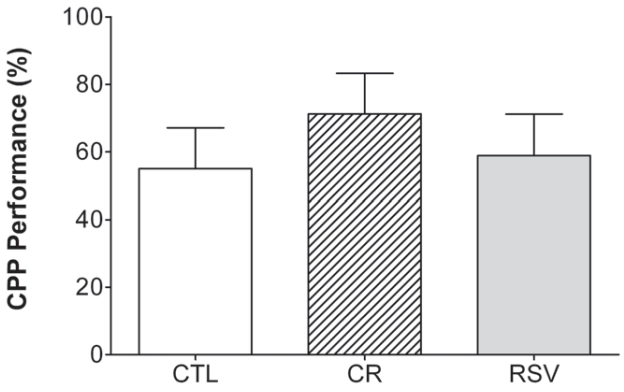


Figure 3. Effects of CR and RSV treatments on percentage of reversal in a conditioned placed preference (CPP) task. Data of control (CTL, n = 8), caloric restricted (CR, n = 8) or resveratrol supplemented (RSV, n = 9) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions are reported. Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g003

many of the previous studies from rodents and humans showed controversial effects. In rodents, CR has been described as beneficial for cognitive performances in mice [12,39] and mainly deleterious in rats [13,14]. In humans a 3-month 30% caloric restriction led to a significant increase in verbal memory scores and was correlated with decreased fasting plasma levels of insulin and high sensitive C-reactive protein [2]. Accordingly to what was observed in humans, we expected positive effects of mid-life onset CR on cognitive functions in this primate model. Very few studies reported information about RSV effect on cognitive function. For example, Kumar et al. showed that administration of resveratrol in rats that received an intracerebroventricular colchicine injection, known to cause loss of cholinergic neurons and cognitive dysfunction that is associated with excessive free radical generation, had a neuroprotective role against colchicine-induced disturbances [40]. Moreover, Joseph et al. demonstrated that resveratrol and more particularly, one of its most efficacious analogue (pterostilbene) were effective in reversing cognitive behavioral deficits, as well as dopamine release, in aged rats and their working memory was correlated with pterostilbene levels in the hippocampus. These previous results allowed us to expect beneficial effects of this polyphenol on memory performances of mouse lemur. In the present report we show that both CR and RSV supplementation were accompanied by maintained or better cognitive and motor performances after 18 months of chronic treatment. Main effects of treatments were observed in the continuous spontaneous alternation task, in which both CR and RSV supplemented animals presented better performances of total alternation compared to CTL animals. RSV supplementation also significantly lowered the number of errors in the circular platform task compared to CTL whereas CR did not significantly change the performances to this test.

Animals of the three groups have comparable motor performances (jump and rotarod tasks) suggesting that both treatments and more particularly CR, did not impair the motor functions of the animals. These two motor tasks require strength, spring and suppleness and mobilize a high amount of energy and all animals were able to achieve them, showing their good general health condition. Since motor performances are not changed with treatments, we can exclude that changes observed in cognitive tasks could be due to motor modifications. On the other side, animals under CR exhibited a significantly increased spontaneous night locomotor activity (LA) with a noteworthy mimetic effect of

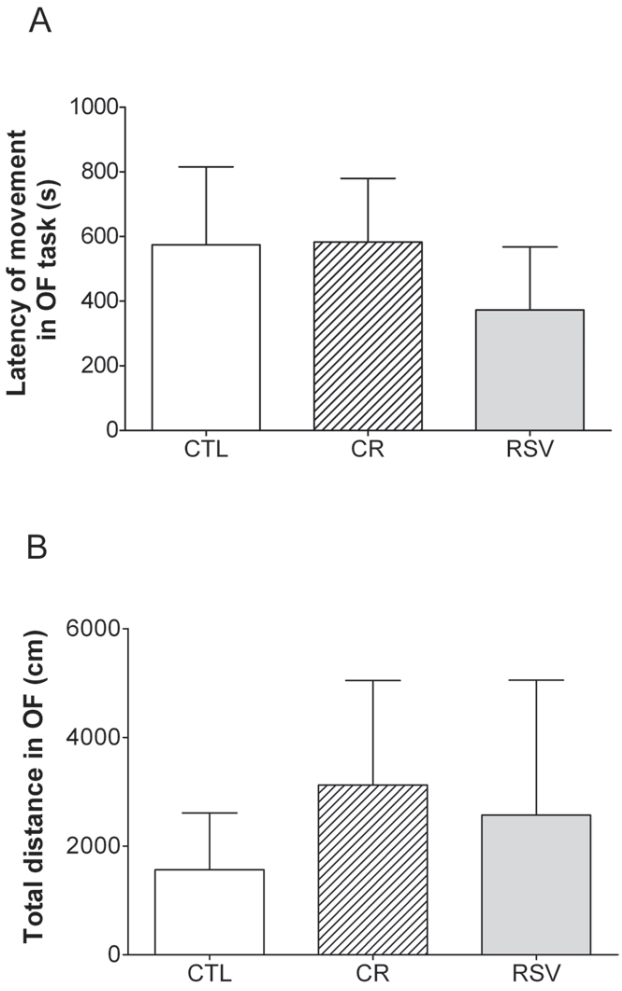


Figure 4. Effects of CR and RSV treatments on cognitive performances in an open field (OF) task. Figure 4A and 4B respectively represent the latency (expressed in sec) before the first movement in the open field and the total distance traveled (expressed in cm) in the open field task of control (CTL, n = 9), caloric restricted (CR, n = 9) or resveratrol supplemented (RSV, n = 10) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions. Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g004

RSV. Since this increased activity occurs during night, it can not be attributed to a food anticipatory activity that has been described to occur during the day in other food deprivation protocols [41]. A previous study already showed that old rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) under a 30% CR presented an increase in spontaneous activity levels [42], what is also consistent with previous observations made in rodents under CR [43]. Since changes in night LA can not be linked to modified motor functions and, since the amplitude of LA rhythms between night and day increased, we can hypothesise that both CR and RSV exert stimulatory effects on circadian clock. Such a property deserves to be further investigated.

We found no evidence of any effect of CR treatment after 18 months of treatment on behavioural performances in the open field task and cortisol levels. Thus, CR treatment, conversely to what observed in mice [12], did not induce more anxiety in CR animals compared to CTL. Comparable findings where also observed under RSV supplementation.

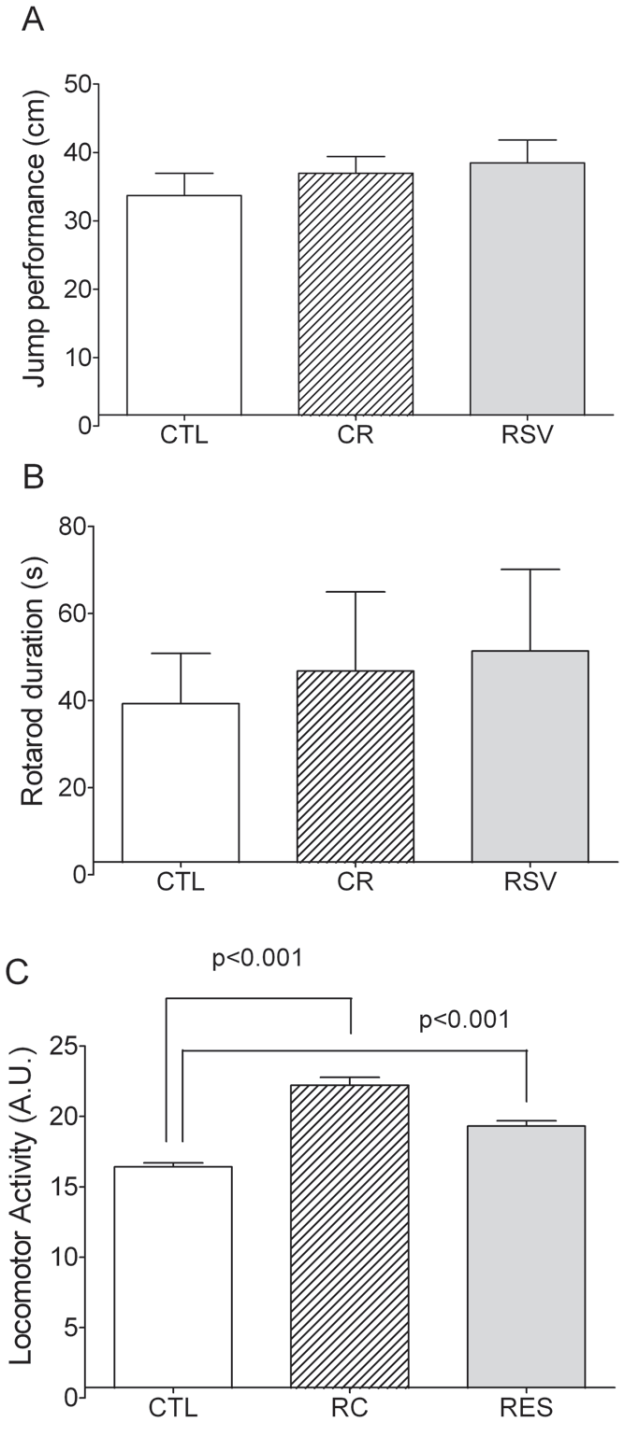


Figure 5. Effects of CR and RSV treatments on physical performances in motor tasks and spontaneous night locomotor activity. Data of control (CTL), caloric restricted (CR) or resveratrol supplemented (RSV) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions are reported. Figure 5A represents physical performances of the animals in a jump task (expressed in cm, with n = 9 CTL, n = 11 CR and n = 10 RSV). Figure 5B represents physical performances of the animals in rotarod task (expressed in sec, with n = 7 CTL, n = 9 CR and n = 8 RSV). Figure 5C represents spontaneous night locomotor activity (expressed in arbitrary units of locomotor activity, with n = 7 CTL, n = 6 CR and n = 7 RSV). Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g005

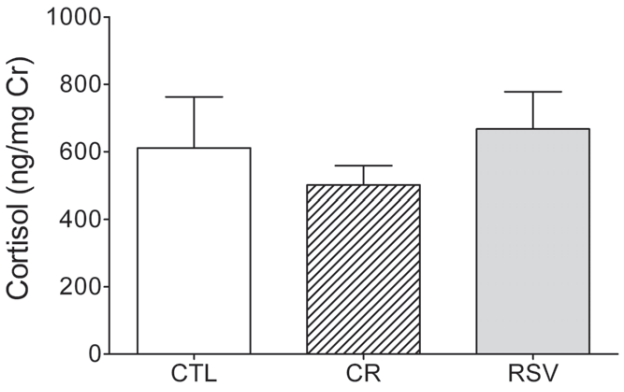


Figure 6. Effects of CR and RSV treatments on cortisol level (expressed in ng/mg of creatinine). Data of control (CTL, n = 9), caloric restricted (CR, n = 10) or resveratrol supplemented (RSV, n = 11) mouse lemurs after 18 months of dietary interventions are reported. Values are mean ± SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0016581.g006

As a spatial reference memory task requiring animals to remember a specific location, the circular platform test is sensitive to hippocampus integrity. Thus, our results showed no deleterious impact of CR on the spatial memory of the mouse lemurs after 18 months of treatment. Indeed, CR animals did not make more errors to find the exit compared to CTL animals and both groups performed the same time to reach the exit in the circular platform task. These results suggest that the CR animals acclimated physiologically to their imposed diet. However, a negative effect of CR on spatial cognition was reported in rats by Yanai et al. using the Morris water maze [14]. Given that injection of glucose improved performance of the CR group to the level of the *ad libitum* group, this negative impact of CR was interpreted by the authors as a reduced glucose availability in the hippocampus for the CR animals. This observation allows us to hypothesize that in CR mouse lemurs a re-allocation of energy distribution to the brain could occur, thereby suppressing a potential deleterious effect of CR on hippocampus-dependent spatial memory task. This hypothesis should be confirmed in further studies in which cognitive tests will be carry out after only a short period of treatment. On the other side, the significantly lower number of errors of RSV supplemented animals in this spatial reference memory task suggested a positive effect of RSV on hippocampus activity or functions. If the mechanism of RSV impacts on brain functions remain unexplored in the mouse lemur, it is widely described that RSV increases the activation of sirtuin 1 (SIRT1), a NAD(+)-dependent deacetylase [44] implied in energy metabolism regulation. Improvement of energy utilisation under RSV supplementation could lead to better specific brain functions.

In the conditioned preference place task, measuring the emotional memory mediated by the amygdala, animals under both treatments exhibit comparable performances compared to CTL. This task was designed to assess learning of associations between a distinctive environment or "place" and appetitive or aversive stimuli. Such learned associations result in approach or avoidance behaviors with respect to these places. There is considerable evidence that the amygdala is fundamentally involved in such reward-stimulus or punishment-stimulus associations [36,45]. However, amygdala-dependent emotional memory tasks are known to be well preserved during normal aging in human [46,47] and the grey mouse lemurs followed here were adults. Ours results corroborate well with the previous observations. Potential effects of both treatments on this brain structure would be probably observed in older mouse lemur but further investigations will be necessary to confirm this hypothesis.

Both dietary treatments led to significantly better performances of total alternation in the continuous spontaneous alternation task than that displayed by the CTL group without changes in partial alternation. This difference between partial and total alternation performances could be explained by the fact that partial alternation is easier to perform for the animals than total alternation, hence the lack of effect in the first task. For total alternation, it is reasonable to hypothesize that similar to CR treatment, RSV supplementation stimulates cognitive functions involved in this continuous spontaneous alternation task. Besides requiring motivation to explore, spontaneous alternation performance critically depends on working memory and strategy efficiency. Such strategy requires precise memory of the temporal order of visited arms. Working memory and flexible strategy are parts of executive functions fundamentally subserved by striato-prefrontal circuits [48,49,50]. Positive effects of RSV observed in this study could be explain by its antioxidant properties that provides neuroprotective effects [19,22] and by its capacities to stimulate cholinergic transmission and consequently improve cognition [20]. Given the central role of cholinergic neurotransmission in attentional processing [51,52], RSV treatment could therefore have a positive impact on task involving executive and memory functions that underlie controlled behaviours requiring a high level of attention.

In conclusion, cognitive performances of adult mouse lemurs under chronic CR are maintained or improved in the case of executive functions. Moreover, the present results show, for the first time in an adult primate, a positive effect of RSV on cognitive function (in both executive function and spatial memory). CR and RSV treatments seemed to induce similar benefits on cognitive functions by probably activating similar brain structures (striato-prefrontal circuits and hippocampus) and have similar effects on locomotor activity. These observations allow us to suggest that RSV could be a good candidate to mimic long-term CR effects. The present results obtained in adult animals are promising with regard to possible positive effects during aging and also support the growing evidences that nutritional interventions can have beneficial effects on brain functions even in adults.

Acknowledgments

Recognition is due to Dr Anisur Rahman for help in proofreading and improving the manuscript. The authors acknowledge the continuing assistance provided by Eric Gueton and Lauriane Dezaire for daily feeding and care provided to animals. Alexandra Guignard, Emilie Georges and Amélie Biland are also thanked for their participation in this project. We thank the RESTRIKAL Consortium: Alexandre Dal-Pan, Jérémy Terrien, Fabien Pifferi, Roger Botalla, Isabelle Hardy, Julia Marchal, Laurine Haro, Martine Perret, Fabienne Aujard, Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Centre National de la Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle, France; Alexandre Zahariev, Isabelle Chery, Stéphane Blanc, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, France; Philippe Zizzari, Jacques Epelbaum, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, UMR 894 Inserm, France; Jean-Luc Picq, Laboratoire de Psychopathologie et Neuropsychologie, UFR Psychologie, France.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JLP FA. Performed the experiments: ADP FP JM. Analyzed the data: ADP FP JLP FA. Contributed reagents/materials/analysis tools: ADP FP JLP FA. Wrote the paper: ADP FP JLP FA. Read and approved the final manuscript: ADP FP JM JLP FA.

References

1. Spindler SR (2009) Biological Effects of Calorie Restriction: From Soup to Nuts. Ageing Research Reviews In Press, Accepted Manuscript.
2. Witte A, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 1255–1260.
3. Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, et al. (2001) Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56: 20–33.
4. Chen D, Guarente L (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. Trends in Molecular Medicine 13: 64–71.
5. Ingram DK, Young J, Mattison JA (2007) Calorie restriction in nonhuman primates: Assessing effects on brain and behavioral aging. Neuroscience 145: 1359–1364.
6. Wakeling L, Ions L, Ford D (2009) Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? AGE 31: 327–341.
7. Howitz K, Bitterman K, Cohen H, Lamming D, Lavu S, et al. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 425: 191–196.
8. Borra MT, Smith BC, Denu JM (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. Journal of Biological Chemistry 280: 17187–17195.
9. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, et al. (2006) Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1[alpha]. Cell 127: 1109–1122.
10. Allard JS, Perez E, Zou S, de Cabo R (2009) Dietary activators of Sirt1. Molecular and Cellular Endocrinology 299: 58–63.
11. Anderson R, Prolla T (2009) PGC-1[alpha] in aging and anti-aging interventions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1790: 1059–1066.
12. Means LW, Higgins JL, Fernandez TJ (1993) Midlife onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive-functionning. Physiology & Behavior 54: 503–508.
13. Markowska AL (1999) Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. Neurobiology of Aging 20: 177–189.
14. Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H (2004) Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. Neurobiology of Aging 25: 325–332.
15. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, et al. (2009) Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. Science 325: 201–204.
16. Jung K, Lee E, Kim J, Zou Y, Sung B, et al. (2009) Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF-kB and AP-1 in aged rat kidney. Inflammation Research 58: 143–150.
17. Fontan-Lozano A, Saez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Domnguez SA, et al. (2007) Caloric Restriction Increases Learning Consolidation and Facilitates Synaptic Plasticity through Mechanisms Dependent on NR2B Subunits of the NMDA Receptor. The Journal of Neuroscience 27: 10185–10195.
18. Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo C, Rotilio G (2008) Benefits from Dietary Polyphenols for Brain Aging and Alzheimer's Disease. Neurochemical Research.
19. Jin F, Wu Q, Lu Y-F, Gong Q-H, Shi J-S (2008) Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. European Journal of Pharmacology 600: 78–82.
20. Schmatz R, Melazzo Mazzanti C, Spanevello R, Stefanello N, Gutierres J, et al. (2009) Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology in press.
21. Abraham J, Johnson R (2009) Consuming a Diet Supplemented with Resveratrol Reduced Infection-Related Neuroinflammation and Deficits in Working Memory in Aged Mice. Rejuvenation Research 12.
22. Sönmez Ü, Sönmez A, Erbil G, Tekmen I, Baykara B (2007) Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. Neuroscience Letters 420: 133–137.
23. Sharma M, Gupta Y (2002) Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Life Sciences 71: 2489–2498.
24. Valenzano D, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, et al. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current Biology 16: 296–300.
25. Génin F, Perret M (2000) Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. Physiology & Behavior 71: 315–321.
26. Giroud S, Perret M, Stein P, Goudable J, Aujard F, et al. (2010) The Grey Mouse Lemur Uses Season-Dependent Fat or Protein Sparing Strategies to Face Chronic Food Restriction. PLoS ONE 5: e8823.
27. Génin F, Perret M (2003) Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (Microcebus murinus): effects of photoperiod and food restriction. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 136: 71–81.
28. Giroud S, Blanc S, Aujard F, Bertrand F, Gilbert C, et al. (2008) Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (Microcebus murinus). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol R1958–R1967.
29. Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, et al. (2010) Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus. Age (Dordr) [Epub ahead of print].
30. Picq JL (2007) Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. Experimental Gerontology 42: 223–232.
31. Dhenain M, Chenu E, Hisley CK, Aujard F, Volk A (2003) Regional atrophy in the brain of lissencephalic mouse lemur primates: Measurement by automatic histogram-based segmentation of MR images. Magnetic Resonance in Medicine 50: 984–992.
32. Kraska A, Dorieux O, Picq J-L, Petit F, Bourrin E, et al. (2010) Age-associated cerebral atrophy in mouse lemur primates. Neurobiology of Aging [Epub ahead of print].
33. Antoniadis EA, Ko CH, Ralph MR, McDonald RJ (2000) Circadian rhythms, aging and memory. Behavioural Brain Research 111: 25–37.
34. Gold PE (2005) Glucose and age-related changes in memory. Neurobiology of Aging 26S: S60–S64.
35. Filali M, Lalonde R (2009) Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. Brain Research 1292: 93–99.
36. McDonald RJ, White NM (1993) A triple association of memory systems - hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. Behavioral Neuroscience 107: 3–22.
37. Weatherall D (2006) The use of non-human primates in research - The Weatherall Report.
38. Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. Journal of Comparative Physiology and Psychology 93: 74–104.
39. Wu A, Sun X, Liu Y (2003) Effects of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. Neuroscience Letters 339: 166–168.
40. Kumar A, Naidu PS, Seghal N, Padi SS (2007) Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Pharmacology 79: 17–26.
41. Challet E (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 180: 631–644.
42. Weed JL, Lane MA, Roth GS, Speer DL, Ingram DK (1997) Activity Measures in Rhesus Monkeys on Long-Term Calorie Restriction. Physiology & Behavior 62: 97–103.
43. Ingram DK, Weindruch R, Spangler EL, Freeman JR, Walford RL (1987) Dietary Restriction Benefits Learning and Motor Performance of Aged Mice. Journal of Gerontology 42: 78–81.
44. Das D, Mukherjee S, Ray D (2010) Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. Heart Failure Reviews.
45. Everitt BJ, Morris KA, Obrien A, Robbins TW (1991) The basolateral amygdala ventral striatal system and conditioned place preference - further evidence of limbic striatal interactions underlying reward-related processes. Neuroscience 42: 1–18.
46. Grieve SM, Clark RC, Williams LM, Peduto AJ, Evian G (2005) Preservation of limbic and paralimbic structures in aging. Human Brain Mapping 25: 391–401.
47. Denburg N, Buchanan TW, Tranel D, Adolphs R (2003) Evidence for preserved emotional memory in normal older persons. Emotion 3: 239–253.
48. Battig K, Rosvold HE, Mishkin M (1960) Comparison of the effects of frontal and caudate lesions on delayed response and alternation in monkeys. J Comp Physiol Psychol 53: 400–404.
49. Wise S, Murray EA, Gerfen CR (1996) The frontal cortex-basal ganglia system in primates. Crit Rev Neurobiol 10: 317–356.
50. Babovic D, O'Tuathaigh CM, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Tighe O, et al. (2008) Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. Neuroscience 155: 1021–1029.
51. Jones DN, Barnes JC, Kirkby DL, Higgins GA (1995) Age-associated impairments in a test of attention: evidence for involvement of cholinergic systems. J Neurosci 15: 7282–7292.
52. Wenk GL (1997) The Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. Neurobiology of Learning and Memory 67: 85–95.

Blood biochemical levels in a non-human primate (*Microcebus murinus*): seasonal, gender and age effects.

Authors: J. Marchal, O. Dorieux, L. Haro, F. Aujard*, M. Perret

Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179 Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Brunoy, France

marchal.julia@gmail.com; olenedorieux@gmail.com; laurine_haro@hotmail.fr; aujard@mnhn.fr; mperret@mnhn.fr

* Corresponding author :

Fabienne Aujard, UMR 7179 CNRS/MNHN

Equipe Mécanismes Adaptatifs et Evolution

1 Avenue du Petit Château, 91800 Brunoy

Phone number: 33 (0)1 60 47 92 37

E-mail: aujard@mnhn.fr

Running title: Blood biochemical levels in the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*)

Abstract

Background: Hematologic and biochemistry data are needed to characterize the health status of animals' populations over time and to relate it to habitat quality or to captive conditions. Blood components and the chemical entities that they transport, change predominantly with sex and age. The aim of this study was to establish, from blood chemistry monitoring, the reference levels in a small prosimian primate, the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*).

Method: In the captive colony, mouse lemurs may live 10-12 years and three groups of ages of both males and females were studied: young (1-3yrs), middle-aged (4-5yrs) and old (6-10yrs). Because life history traits of this primate are highly dependent of photoperiod (body mass, reproduction), we also assessed the effect of season.

Results: Using the "Vetscan Comprehensive Diagnostic Profile", results demonstrated significant effects of season, especially in blood protein levels and glucose rates regardless

gender or age. The main effect of age concerns the blood markers of renal functions such as phosphoremia, creatinemia and uremia that show significant increases with age.

Conclusion: These results were highly similar with those obtained in other primate species and can serve as references for future research and investigations in this species.

Keywords: aging, blood biochemical markers, grey mouse lemur, *Microcebus murinus*, seasonality.

Introduction

Hematologic and biochemistry data are needed to characterize the health status of animals' populations over time and to relate health to habitat or captive habitat quality. Such information may be of the utmost importance when screening for diagnosis of diseases, infections or routine check-up of captive populations. Numerous studies have demonstrated the importance of regular monitoring of blood biochemical markers in different contexts in various animal species (turtles: [1], rattlesnakes: [2], squirrels: [3], red howler monkeys: [4]). Blood or serum biochemistry is effective to detect stress induced by capture, by captivity and by research procedures. For example, the quantified haptoglobin concentrations are good indicators to control the stress of capture and of retention in the Steller Sea Lion and to detect potential unknown stressors on free-ranging animals [5]. Recently, blood biochemical markers were used to highlight the effects of a short-term effort on dugongs [6]. Such markers have also been used to quantify and to compare blood acid–base disturbances associated with capture and more, to investigate how interspecific differences in the physiological stress response could be related to life history ecology and phylogeny [7]. Likewise comparisons between species of blood biochemistry levels, could be useful to prevent diseases or pre-disease states such as kidney dysfunction in chimpanzees and humans [8], or rhabdomyolisis in marine mammals [6]. Finally, blood chemistry profiles are used as bio-markers of disease evolution, such as atherosclerosis in rabbits [9] or organohalogen contamination in raptor nestlings [10].

Blood components change with several factors, especially with sex and age but few studies deal with a follow up of biochemistry markers. Few studies on animal development especially in primates' species such as Chimpanzee report the utility to follow hematologic and biochemical markers in cross-sectional and longitudinal analyses [11]. Blood biochemical parameters have been shown to be subject to change with increasing age in many animal

species [12; 13]. In humans, reference values of several blood components in young, middle-aged, old and centenarian's individuals have been provided [14; 15]. From long term studies, blood biomarkers may be used to define the biological age of an individual by comparing its various biochemical parameters. For some species including humans, studies have reported standard values (primates: [16]; humans: [14;17;18]). However, standard values for exotic species or new primate experimental model such as the Grey Mouse Lemur are not available.

The main objective of this study was thus to establish, from cross-sectional blood chemistry monitoring, the reference values for blood biochemical parameters in the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*), a nocturnal prosimian primate considered as a model for ageing research [19]. This species may live in captivity 10-12 years and exhibits behavioural and physiological changes that are dependent on the photoperiod. Data were collected over a 3-year period on 78 mouse lemurs, aged from 1 to 10 years, which represent around 15% of the Brunoy breeding colony and the potential effect of sex, season and age were analyzed. Our study may provide a reference for basic diagnostic and clinical care of mouse lemurs in captivity or in the field.

Results

Body mass

In mouse lemurs, body mass varied significantly among the two sex groups and between season, as we observed an important general effect of sex ($dF_{1/67}$, $F=7.094$, $p<0.01$) and an important effect of season ($dF_{1/67}$, $F=20.45$, $p<0.001$). Sex-specific and seasonal differences were independent of age ($dF_{2/67}$, $F=0.284$, $p=0.75$). Regardless of age, male mouse lemurs showed a 20% lower body mass than females and animals in LD season presented a 22% lower body mass than animals in SD season (Figure 1).

Electrolytes (Tables 1 and 2)

Sodium (Na). Blood Na concentrations averaged 145.5 mmol/L independently of sex ($dF_{1/66}$, $F=0.006$, $p=0.94$), season ($dF_{1/66}$, $F=0.649$, $p=0.42$), and age ($dF_{2/66}$, $F=1.263$, $p=0.29$).

Potassium (K). Blood K concentrations averaged 7 mmol/l, were not significantly different according to sex, season and age (respectively: $dF_{1/54}$, $F=0.462$, $p=0.5$; $dF_{1/54}$, $F=0.65$, $p=0.42$ and $dF_{2/54}$, $F=0.938$, $p=0.39$).

Calcium (Ca) – Phosphorus (PHOSP) metabolism. No effect was observed on blood calcium concentrations, 10 mg/dL on average, between sex ($dF_{1/67}$, F=0.447, p=0.51), between season ($dF_{1/67}$, F=0.06, p=0.81) and between age ($dF_{2/67}$, F=0.676, p=0.51). By contrast, PHOSP concentrations were significantly higher in LD season than values observed in SD season ($dF_{1/67}$, F=7.501, p<0.01) regardless to sex ($dF_{1/67}$, F=1.71, p=0.19) or to age ($dF_{2/67}$, F=0.184, p=0.83) (Figure 2).

Glycaemia (Tables 1 and 2)

Glucose (GLU). A significant effect of season was found for blood glucose concentrations ($dF_{1/67}$, F=4.351, p=0.04) with higher values observed in LD season, regardless to sex ($dF_{1/67}$, F=0.04, p=0.84) or age groups ($dF_{2/67}$, F=0.811, p=0.45) (Figure 2).

Enzymes activity (Tables 1 and 2)

Alkaline phosphatase activity (ALP). Measurements of ALP averaged 55 U/L without any significant difference by sex, season or age (respectively: $dF_{1/67}$, F=0.183, p=0.67; $dF_{1/67}$, F=1.54, p=0.22 and $dF_{2/67}$, F=0.996, p=0.37).

Alanine aminotransferase activity (ALT). Equally, averaging 200 U/L, ALT values did not significantly varied between sex, season and across age groups (respectively: $dF_{1/67}$, F=0.029, p=0.86; $dF_{1/67}$, F=1.103, p=0.29 and $dF_{2/67}$, F=0.161, p=0.85).

Amylase (AMY). Blood amylase values were highly variable among animals (from 32 to 1362 U/L) and showed no significant effect of sex, season nor age (respectively: $dF_{1/66}$, F=0.525, p=0.47; $dF_{1/66}$, F=0.445, p=0.5 and $dF_{2/66}$, F=0.059, p=0.94).

Renal function markers (Tables 1 and 2)

Creatinine (CRE). Creatinine levels (average 0.25 mg/dL) varied according to age ($dF_{2/64}$, F=5.99, p<0.01) (Figure 3) and between sex ($dF_{1/64}$, F=4.349, p=0.04) with higher values in females compared to males, independently to the season ($dF_{1/64}$, F=0.011, p=0.91). While middle-aged animals had no different CRE levels compared to young animals (p=0.80), aged animals presented significant higher levels of CRE when compared to young animals levels (p<0.01).

Blood urea nitrogen (BUN). Blood urea concentrations, averaged 17 mg/dL, revealed a significant effect of age ($dF_{2/67}$, F=6.95, p<0.01) (Figure 3), independently to sex ($dF_{1/67}$,

F=0.032, p=0.86) or to season ($dF_{1/67}$, F=0.291, p=0.59). Aged animals presented higher levels when compared to young animals levels (p<0.001), while there was no difference when comparing BUN levels of middle-aged animals and young animals (p=0.19) (Figure 3).

Proteins levels (Tables 1 and 2)

Total protein (TP). In mouse lemurs, TP values varied from 3 to 12 g/dL and were significantly higher during the SD season compared to LD season ($dF_{1/67}$, F=13.43, p<0.001) without an effect of sex ($dF_{1/67}$, F=1.33, p=0.25) or of age ($dF_{2/67}$, F=0.943, p=0.39) (Figure 2).

Albumin (ALB). Likely to TP levels, ALB values significantly differed accordingly to season, with higher levels during the SD season ($dF_{1/63}$, F=8.22, p<0.01) without an effect of sex ($dF_{1/63}$, F=0.012, p=0.91) or of age ($dF_{2/63}$, F=0.467, p=0.63) (Figure 2).

Total bilirubin (TBIL). Bilirubin values did not significantly differed between seasons ($dF_{1/61}$, F=1.613, p=0.21) and age groups ($dF_{2/61}$, F=1.368, p=0.26) although a tendency to be lower in females was observed ($dF_{1/61}$, F=3.809, p=0.055).

Globulin concentration (GLOB). GLOB levels averaged 3.6 g/dL but were significantly impacted by season with higher levels in LD season compared to SD ($dF_{1/52}$, F=12.35, p<0.001) (Figure 2) and also modified by age ($dF_{2/52}$, F=4.56, p=0.01), both seasonal and age effects were independent of sex ($dF_{1/52}$, F=2.92, p=0.09). Middle-aged animals had higher levels compared to young animals (p<0.01), and aged animals presented significant higher levels of GLOB too when compared to young animals levels (p=0.02) (Figure 3).

Relation between body mass and biochemical markers

Due to the high seasonal changes in physiological functions, potential relationships between blood markers and body mass have been evaluated (see, Table 3).

ALP levels and body mass were significantly correlated in the SD season (r=0.32, p=0.03). However, this relation was not observed in the summer like season (r=0.10, p =0.46. Similarly, BUN rates and body mass were highly related in the SD season (r=0.41, p<0.01) but not in the LD season (r=0.14, p= 0.63). In addition, during the winter-like season, GLU levels exhibited a strong positive relation with body mass (r=0.43, p<0.01), which was not the case for the GLU levels in LD photoperiod (r=0.16, p=0.77). Finally, there was a significant

relation between PHOSP measures and body mass again in the short-day season (r=0.37, p=0.01) while no relation was found during the summer-like season (r=0.16, p=0.83).

Relation between chronological age and biochemical markers

We tested the relationship between blood markers and animals' age in years. Chronological age was considered as the independent variable. Blood urea nitrogen, creatinine and globulin levels increased sharply across age, as exemplified by significant correlation between the chronological age and these parameters (BUN: r=0.46, p<0.001; CRE: r=0.28, p<0.01 and GLOB: r=0.20, p=0.05 – Figure 4).

Discussion

The potential effect of gender, season and age on blood parameters were characterized for the first time in mouse lemurs through a cross-sectional study.

Comparison of mouse lemurs' values to "normal" biochemical blood parameters recorded in other mammals or primate species revealed both similarities and discrepancies depending on the parameter tested. Compared to ranges described for mice and rats (VetScan references for small animals), mouse lemurs presented similar scales for albumin, alkaline phosphatase activity, total bilirubin and calcium levels but exhibited higher levels of alanine aminotransferase activity, blood urea nitrogen, creatinine and total protein. Compared to other non-human primates' species, mouse lemurs presented lower albumin and total protein levels (squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), macaque rhesus (*Macaca mulatta)* and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)), while they exhibited higher values for blood urea nitrogen parameter (Fiocruz Primate Center, [16]). We also made the comparison with values found in chimpanzees [11]. Creatinine, calcium and total bilirubin did not differ between both species. However, in mouse lemurs values for glucose, blood urea nitrogen, phosphorus, potassium, total protein, albumin and globulin were higher. The most important difference was for alanine aminotransferase activity, around five times higher in mouse lemurs compared to others primates' species. While the liver is the seat of a multitude of biochemical and enzymatic activity, it represents 2% of the total body weight in humans, whereas in the mouse lemur this weight is around 8% (unpublished data), a value possibly explaining the high levels of alanine aminotransferase in this prosimian.

Sex differences

In mouse lemurs, no sex-specific difference was observed in blood biochemical values except for creatinine levels that were higher in females. In many species, serum creatinine levels have been shown to be generally higher in males (non-human primates: [20; 21]; apes: [11]; humans: [22]). This gender difference is due to a higher muscle mass and turnover, in males compared to females [23]. It is noteworthy that females *M. murinus* are heavier than males whatever the season both in wild [24] and in captivity. However, despite a significant 20% higher body mass in females, no relationship between body mass and creatinine levels was found. This result suggests that either female body mass is not related to increased free fat mass or others parameters are involved.

Seasonal differences

Among the 14 parameters studied, almost half of them are impacted by seasonality and could be related to life history traits of mouse lemurs, especially seasonal variations in energy balance and fat storage during the resting season [25;26;27;28].

In mouse lemurs, glucose and phosphorus levels were higher in long-day photoperiod. These two parameters are closely related to nutrition or malnutrition in mammals. Despite blood samples were done when animals were fasting, high glucose values in summer reflect the increase in food intake during the breeding season. This has already been observed in the black bear, which presented higher glucose levels during the predenning season (July-December) [29]. Similarly, in the brown hares (*Lepus europaeus*) highest glucose and phosphorus contents were observed in summer and the lowest in the fall [30]. As for glucose, higher levels of phosphorus in summer are related to changes in food intake and to modification in energetic metabolism regulation. Moreover, the relationship between both blood glucose; phosphorus and body mass in mouse lemurs in the winter season is consistent with the known relationships between body fat (white adipose tissue), glucose and food intake. This result is corroborated by a recent study on markers of insulin sensitivity in the mouse lemurs [31]. Besides, albumin, globulin and total proteins levels were significantly higher during the winter season. The significant increase in albumin, globulin and key proteins regulating the colloidal osmotic pressure of blood may be due to the reduction of water consumption and of food intake during the winter, both factors having effect on blood composition and osmorality by increasing the blood components concentration. Seasonal effects on albumin levels have been reported in birds (*Columba livia*) with a low values in winter [32] but, in contrast high levels in dolphins during winter [33]. However, albumin may

vary consistently according to environmental factors such as housing conditions (non-human primates: [34]). More, total protein values may reflect nutritional status as well as kidney and liver dysfunctions with low levels indicating liver, kidney or absorption disorders. In mouse lemurs, high values in protein content during the winter could also be linked to changes in renal function or to a decrease in muscle mass owing to the low motor activities. They could be also related to the fact that, during the winter season, endogenous lipids are the main source of energy utilized and proteins are spared [35]. All seasonal differences in blood biochemistry observed in mouse lemurs reflect adaptive seasonal changes in energy balance and appear to have any clinical significance.

Age differences

Total blood urea nitrogen, globulin and creatinine were increased in old animals, independently of gender. These parameters are relevant markers of renal function known to decline with age. In mammals, a decreased renal function is associated with a drop in the glomeruli numbers, a decreased renal blood flow and pressure as a result of changes in cardiac function or persistent vasoconstriction. In the literature, age-related increases in these markers have already been observed (BUN; human: [15]; GLOB; black bear: [29]; chimpanzees: [11]; humans: [15]; CRE; non human primates: [21]; humans: [15]). Age-related alterations in renal function are observed in mouse lemurs and, in captivity, most deaths are due to renal insufficiency [36]. Chronic nephrosis in aged animals may thus explain the age-related increase in creatinine values.

Because the Grey mouse lemur is presently considered as a pertinent model for experimental studies on ageing processes [19] and for anti-aging protocols [37; 31], this study brings relevant and useful biomarkers to monitor health status of captive animals. Enzymatic activity markers and electrolytes weakly vary within sex and season and may be used for assessing general health status. By contrast, taking into account that they are modified by sex and season, blood parameters linked to renal function or protein metabolism have to be followed up to control age-related changes in this primate species.

Materials and methods

Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European

Communities Council Directive (86/609/EEC). Studies were conducted through the agreement of Internal Review Board of the UMR 7179 and in accordance with the recommendations of the Weatherall report, ‘‘The use of non-human primates in research’’, special attention was paid to the welfare of animals during this work to minimize nociception [38].

Animals and husbandry

All grey mouse lemurs studied were born in the laboratory breeding colony of Brunoy (Muséum National d’Histoire Naturelle, UMR 7179 CNRS/MNHN, France; Agreement DDPP # D91-114-1) from a stock originally caught along the south-western coast of Madagascar 45 years ago. General conditions of captivity were maintained constant. Animals were exposed at ambient room temperature (24–26 °C) and relative humidity (55%). Animals were fed *ad libitum* every two days with fresh fruits (apples and banana) and a home-made mixture of white cheese, ginger bread, baby cereals, milk and egg. Water was always given *ad libitum*. Biological rhythms of mouse lemurs are dependent on photoperiod. Exposure to long days (>12h light per day) entrains seasonal activation of reproductive function associated with increased behavioral and physiological activity. In contrast, exposure to short days (<12h light per day) leads to pronounced fattening, reduced activity, torpor and complete sexual rest in both sexes [39]. In the breeding colony, seasonal variations of physiological functions are artificially maintained by alternating a 6-month period of summer-like long-day (LD: 14h of light / day), with a 6-month period of winter-like short-day (SD: 10h of light / day) under artificial light: fluorescent tubes (white light, 250 lux, wavelength peak at 488 nm). Seventy-eight animals were used: 43 females (age from 1 to 10 years) and 35 males (age from 1 to 8 years). None of the females examined were pregnant or lactating. To ensure the complete stabilization of the physiological status of animals following changes in photoperiod, mouse lemurs were studied 1-2 months after the onset of the LD photoperiod (breeding season) and symmetrically 1-2 months after the onset of the SD photoperiod (resting season). All tests were realized during the last 4 hours before the nocturnal active period.

The median survival time, time at which half of the population has died, is generally used to delineate the adult and aged portions of a population. In the captive colony, the median survival time of mouse lemurs is 4.9 years for females and 5.7 years for males [19]. Consequently, three age groups were delineated: young animals (1-3 yrs old), middle-aged animals (4-5 yrs old) and old animals (6-10 yrs old).

Total blood samples collection

Blood collections were taken via the saphenous vein without anaesthesia during the daily resting phase just before the nocturnal activity period. Animals were thus in a fasting state. Blood samples (100 to 150 µL, i.e 0.1% of total blood volume) were collected in lithium-heparinised tubes just before analysis. The body mass of each animal was measured before each measurement to monitor body mass variations.

Biochemical levels measurements

Measurements of blood components were made using a Vetscan VS2 Chemistry Analyzer (© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587 United-States). This system uses dry and liquid reagents to provide veterinary *in vitro* quantitative determinations of specifics physiologic parameters. A special rotor "Vetscan Comprehensive Diagnostic Profile" (Comprehensive Diagnostic Profile, Abaxis, Union City, Calif) used in the study provided the assay of biochemical markers in lithium-heparinized whole blood: total protein concentration (TP), albumin concentration (ALB), total bilirubin concentration (TBIL), globulin concentration (GLOB), blood urea nitrogen (BUN), glucose concentration (GLU), creatinine (CRE), inorganic phosphorus (PHOSP), sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), alanine aminotransferase activity (ALT), amylase (AMY) and alkaline phosphatase activity (ALP).

Whole blood samples obtained by venipuncture were homogenous before transferring to the reagent rotor by gently inverting the collection tubes several times just prior to the transfer in the rotor. The VetScan Chemistry Analyzer automatically calculates and prints the analyte concentrations in the analyzed sample. Physical interferents: blood hemolysis (HEM), icterus (ICT), and lipemia (LIP) may cause changes in the components concentrations. The VetScan Chemistry Analyzer suppressed any results that were affected by >10% interference from "HEM", "LIP", "ICT". In our studied samples, the mean value of these parameters ranged from 0 to 3% without any significant difference between season, sex and age ($p>0.1$).

Out of range individuals

For some biochemical parameters, the VetScan analyzer reported out of range values mainly in male mouse lemurs during the long photoperiod. Creatinine levels in two males were too low to be detected by the VetScan. Similarly, sodium levels were below 100mmol/L in one male and could not be measured by the VetScan. For albumin measures, four males in long photoperiod had a too low rate, below 1.5g/dL. Finally for potassium levels, three

females in long-day season also showed a rate higher than 8.5mmol/L, undetectable by the auto-analyzer. For certain other individuals, the measures were not obtained for these criteria only because blood sample was hemolyzed during the assay.

Data analysis and statistics

The distribution of blood biochemistry variables was evaluated separately according to season, sex and age. Using the Shapiro-Wilk goodness-of-fit test, most variables were not normally distributed and they were log transformed for analysis. The median, 25% and 75% quartiles and range (min-max) were determined to illustrate data for males and females (Table 1 and table 2). Three-way ANOVA and post-hoc tests were used to assess potential effects of sex, season and age. For each biochemical marker, crossed effects: sex*season, sex*age, season*age and sex*season*age were also analyzed. Simple linear regressions were also used to determine the significance levels of correlations among blood variables and body weight or age. All analyses were performed with R version 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria). A level of $p < 0.05$ was set for significance, and all values are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM).

Author's contribution

JM, OD and LH participated in experimentation. FA and MP conceived the study and its design. JM performed the statistical analysis. JM, MP, FA, OD have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content and all authors have given final approval of the version to be published.

Acknowledgements

The authors acknowledge the continuing assistance provided by Sandrine Bazin-Gondor and Eric Gueton and Didier Lavoine for daily feeding and care provided to animals. Laurine Haro and Sandrine Bazin-Gondor are recognised for expert technical assistance.

References

1 Metin K et al: **Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle Emys orbicularis**. Acta Vet Brno 2006, 75, 49-56.

2 Allender MC, Mitchell MA, Phillips CA, Gruszynski K & Beasley VR: **Hematology, plasma biochemistry, and antibodies to select viruses in wild-caught Eastern**

massasauga rattlesnakes (Sistrurus catenatus catenatus) from Illinois. J Wildlife 2006, Dis 42, 107-114.

3 Twente JW & Twente JA: **Concentrations of D-glucose in blood of Citellus Lateralis after known intervals of hibernating periods**. J Mammal 1967, 48, 381.

4 Vie JC, Moreau B, de Thoisy B, Fournier P, Genty C: **Hematology and serum biochemistry values of free-ranging red howler monkeys (Alouatta seniculus) from French guiana**. J Zoo Wildlife Med 1998, 29, 142-149.

5 Thomton JD, Mellish JAE: **Haptoglobin concentrations in free-range and temporarily captive juvenile Steller sea lions.** J Wildlife Dis 2007, 43, 258-261.

6 Lanyon J M, Sneath HL, Long T: **Evaluation of Exertion and Capture Stress in Serum of Wild Dugongs (Dugong Dugon)**. J Zoo Wildlife Med 2012, 43, 20-32.

7 Mandelman JW, Skomal GB: **Differential sensitivity to capture stress assessed by blood acid-base status in five carcharhinid sharks**. J Comp Physiol 2009, B 179, 267-277, doi: 10.1007/s00360-008-0306-4.

8 Eder G: **A longitudinal study of the kidney function of the chimpanzee (Pan troglodytes) in comparison with humans**. Eur J Clin Chem Clin 1996, 34, 889-896.

9 Dontas IA et al: **Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time- or stress-effect**. Lipids Health Dis 2011, 10, doi:Artn 139 doi: 10.1186/1476-511x-10-139.

10 Sonne C, Bustnes JO, Herzke D, Jaspers VL, Covaci A, Eulaers I, Halley DJ, Moum T, Ballesteros M, Eens M, Ims RA, Hanssen SA, Erikstad KE, Johnsen TV, Rigét FF, Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M: **Blood plasma clinical-chemical parameters as biomarker endpoints for organohalogen contaminant exposure in Norwegian raptor nestlings**. Ecotoxicol Environ Saf. Jun; 80:76-83. Epub, 2012.

11 Herndon GH, Tigges J: **Hematologic and blood biochemival variables of captive Chimpanzees: Cross-sectional and longitudinal analyses**. Comparative Medicine 2001, Vol 51, n1, pages 60-69.

12 Ihrig M, Tassinary LG, Bernacky B, Keeling ME: **Hematologic and serum biochemical reference intervals for the chimpanzee (Pan troglodytes) categorized by age and sex**. Comp Med 2001, Feb;51(1):30-7.

13 Mohri M, Sharifi K, Eidi S: **Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults**. Res Vet Sci 2007, 83, 30-39, doi: 10.1016/j.rvsc.2006.10.017.

14 Fraser CG et al: **Biological variability of 26 clinical chemistry analytes in elderly people**. Clin Chem 1989, 35, 783-786.

15 Tietz NW, Shuey DF, Wekstein DR: **Laboratory values in fit aging individuals - Sexagenarians through centenarians**. Clin Chem 1992, 38, 1167-1185.

16 Andrade MC et al: **Biologic data of Macaca mulatta, Macaca fascicularis, and Saimiri sciureus used for research at the Fiocruz Primate Center**. Mem I Oswaldo Cruz 2004, 99, 581-589.

17 Schiele F et al: **Total bone and liver alkaline-phosphatases in plasma - Biological variations and reference limits**. Clin Chem 1983, 29, 634-641.

18 Kergoat MJ, Leclerc BS, Petitclerc C, Imbach A: **Discriminant biochemical markers for evaluating the nutritional status of elderly patients in long-term care**. Am J Clin Nutr 1987, 46, 849-861.

19 Languille S et al: **The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies**. Ageing Res Rev 2012, 11, 150-162, doi:S1568-1637(11)00054-7 [pii] 10.1016/j.arr.2011.07.001.

20 Takeshita RSC, Monteiro FOB, de Miranda Lins e Lins FL, da Silva GA, Faturi C, Coutinho LN, Monteiro MVB, Kugelmeier T, de Castro PHG, Muniz JAPC: **Hematological, hepatic, and renal evaluation in Aotus azarai infulatus**. Journal of Medical Primatology 2011, Volume 40, Issue 2, pages 104–110.

21 Pierre PJ, Sequeira MK, Corcoran CA, Blevins MW, Gee M, Laudenslager ML, Bennett AJ: **Hematological and serum biochemical indices in healthy bonnet macaques (Macaca radiata)**. Journal of Medical Primatology 2011, Volume 40, Issue 5, pages 287–293.

22 Groesbeck D et al: **Age, gender, and race effects on cystatin C levels in US adolescents**. Clin J Am Soc Nephro 2008, 3, 1777-1785, doi:10.2215/Cjn.00840208.

23 Stevens VK et al: **Trunk muscle activity in healthy subjects during bridging stabilization exercises**. Bmc Musculoskel Dis 2006, 7, doi:Artn 75 Doi 10.1186/1471-2474-7-75.

24 Martin RD: **A review of the behaviour and ecology of the lesser mouse lemur (Microcebus murinus)**. Ecology and behaviour of primates, Academic press, London, pages 1-68, 1973.

25 Perret M: **Energetic advantage of nest-sharing in a solitary primate, the lesser mouse lemur (Microcebus murinus)**. J Mammal 1998, 79, 1093-1102.

26 Aujard F, Perret M, Vannier G: **Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character?** J Comp Physiol 1998, *B* 168, 540-548.

27 Perret M: **Environmental and Social Determinants of Sexual Function in the Male Lesser Mouse Lemur (Microcebus-Murinus)**. Folia Primatol 1992, 59, 1-25.

28 Genin F, Perret M: **Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs**. Physiology & Behavior 2000, 71, 315-321.

29 Matula GJ, Lindzey JS, Rothenbacher HJ: **Sex, age, and seasonal differences in the blood profile of black bears captured in Northeastern Pennsylvania**. Bears: Their Biology and Management 2007, Vol. 4, 1980 Pages 49-56.

30 Massányi P, Slamečka J, Lukáč N, Capcarová M, Mertin D, Jurčík R: **Seasonal variations in the blood biochemistry of brown hare**. Medycyna Weterynaryjna 2009, Vol. 65 No. 6 pp. 389-393.

31 Marchal J, Blanc S, Epelbaum J, Aujard F, Pifferi F: **Effects of chronic calorie restriction or dietary resveratrol supplementation on insulin sensitivity markers in a primate, Microcebus murinus**. PLoS One 7(3):e34289. Epub 2012 Mar 30.

32 Shah SN, Ganayi BA, Shahnawaz M et al: **Seasonal influence on some blood and biochemical parameters of pigeons (Columba livia) in Rajasthan, India**. Comparative Clinical Pathology, Online First, 19 March 2012.

33 Hall AJ et al: **Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Sarasota Bay, Florida**. Comp Biochem Phys 2007, A 148, 266-277, doi:DOI 10.1016/j.cbpa.2007.04.017.

34 Fox M, Brieva C, Moreno C, MacWilliams P, Thomas C: **Hematologic and serum biochemistry reference values in wild-caught white footed Tamarins (Saguinus Leucopus) housed in Captivity**. J Zoo Wildlife Med 2008, 39, 548-557.

35 Nelson RA: **Protein and fat-metabolism in hibernating bears**. Fed Proc 1980, 39, 2955-2958.

36 Perret M: **Influence of captivity and social-groups on Lesser Mouse Lemur physiology**. 1. Stress-Effects in Microcebus-Murinus. Folia Primatol 1982, 39, 63-114.

37 Dal-Pan A et al: **Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in Microcebus murinus**. Age 2011, 33, 15-31, doi:DOI 10.1007/s11357-010-9156-6.

38 Weatherall FRS D: **The use of non-human primates in research**, The Weatherall report, 2006.

39 Perret M, Aujard F: **Regulation by photoperiod of seasonal changes in body mass and reproductive function in gray mouse lemurs (Microcebus murinus): Differential responses by sex**. Int J Primatol 2001, 22, 5-24.

Tables

Table 1. Blood biochemical markers during the short-day season (SD).

	Short-day season					
	Male			Female		
Parameter (units)	Median	25-75% quartiles	Range (min-max)	Median	25-75% quartiles	Range (min-max)
Na (mmol/L)	141	138 - 143	138 - 147	146	141 - 148	48 - 152
K (mmol/L)	6.45	6.1 - 7.2	5.9 - 7.8	7	6 - 7.7	2.4 - 8.5
Ca (mg/dL)	9.9	9.5 - 10.3	9.4 - 10.8	10.3	10.1 - 10.7	4.1 - 11
PHOSP (mg/dL)	5.1	4.3 - 5.7	4.3 - 8.1	5.4	4.6 - 6	2.6 - 13
GLU (mg/dL)	100	81 - 107	67 - 169	101	75 - 117	51 - 171
ALP (U/L)	52	45 - 66	26 - 74	49	37 - 51	16 - 202
ALT (U/L)	200	158 - 283	83 - 591	179	129 - 242	71 - 495
AMY (U/L)	226	43 - 286	38 - 423	161	59 - 227	32 - 356
CRE (mg/dL)	0.2	0.1 - 0.2	0 - 0.6	0.3	0.2 - 0.5	0.1 - 3.2
BUN (mg/dL)	15	13 - 23	12 - 34	18	14 - 24	5 - 77
TP (g/dL)	9.8	9.1 - 10.1	9.1 - 11	11.3	10.1 - 11.9	3.5 - 13.7
ALB (g/dL)	6.2	5.7 - 6.5	4.8 - 6.5	5.6	5 - 6.5	1.6 - 6.5
TBIL (mg/dL)	0.4	0.4 - 0.4	0.3 - 0.5	0.4	0.3 - 0.4	0 - 0.5
GLOB (g/dL)	3.7	0 - 4.2	0 - 4.7	4.5	0 - 5.4	0 - 7.8

Median, 25%-75% quartiles and range (minimum-maximum) of blood biochemical markers during the short-day season in males and females mouse lemurs.

Table 2. Blood biochemical markers during the long-day season (LD).

	Long-day season					
	Male			Female		
Parameter (units)	Median	25-75% quartiles	Range (min-max)	Median	25-75% quartiles	Range (min-max)
Na (mmol/L)	147	143 - 149	100 - 151	148	146 - 149	116 - 151
K (mmol/L)	7.25	6.4 - 7.9	2.3 - 8.5	7.8	7.1 - 7.9	5.8 - 8.5
Ca (mg/dL)	10.3	9.8 - 10.6	4.2 - 12.2	10.3	9.6 - 10.5	8.1 - 10.9
PHOSP (mg/dL)	6.2	5 - 8.1	2.6 - 12.6	6.9	5.9 - 8.1	5.1 - 12.7
GLU (mg/dL)	116	89 - 144	51 - 226	114	108 - 130	75 - 192
ALP (U/L)	58	47 - 80	26 - 87	58	49 - 64	28 - 144
ALT (U/L)	204	143 - 262	75 - 377	218	166 - 368	116 - 749
AMY (U/L)	165	99 - 249	33 - 1362	175	125 - 242	33 - 680
CRE (mg/dL)	0.2	0.2 - 0.3	0.2 - 0.6	0.3	0.3 - 0.4	0.2 - 1.1
BUN (mg/dL)	17.5	13 - 21	6 - 33	17.5	12 - 26	8 - 103
TP (g/dL)	8.2	7.8 - 8.9	2.9 - 9.8	8.6	8 - 8.8	6 - 9.3
ALB (g/dL)	4.85	4.4 - 5.2	1.5 - 5.6	5.1	4.8 - 5.4	3.4 - 5.6
TBIL (mg/dL)	0.4	0.3 - 0.4	0.2 - 0.5	0.3	0.3 - 0.4	0.3 - 0.5
GLOB (g/dL)	3.2	3 - 4.1	1.4 - 5.1	3.25	3 - 4	2.3 - 5.4

Median, 25%-75% quartiles and range (minimum-maximum) of blood biochemical markers during the long-day season in males and females mouse lemurs.

Table 3. Relation between blood biochemical parameters and body mass.

Dependent variables	Independent variables	LD season	SD season
ALP (U/L)	**Body mass (g)**	n=39, r=0.10	*n=37, r=0.32* *
BUN (mg/dL)		n=39, r=0.14	*n=37, r=0.41* **
GLU (mg/dL)		n=39, r=0.16	*n=37, r=0.43* **
PHOSP (mg/dL)		n=39, r=0.16	*n=37, r=0.37* *

Sample size for each photoperiod, LD season: long-day season (summer) and SD season: short-day season (winter) and Pearson correlation coefficient r are given for each regression, as dependent and independent variables. Statistical significance was considered when $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**), NS: non significance.

Figure legends

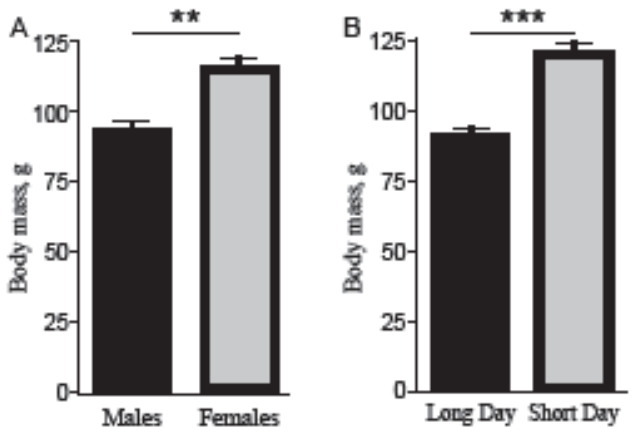


Figure 1. Means and s.e.m of mouse lemurs body mass, in grams, which was significantly different between A: sexes (males and females) and between B: seasons (LD: long-day season; SD: short-day season). Statistical significance was considered when $p<0.01$ (**) and $p<0.001$ (***).

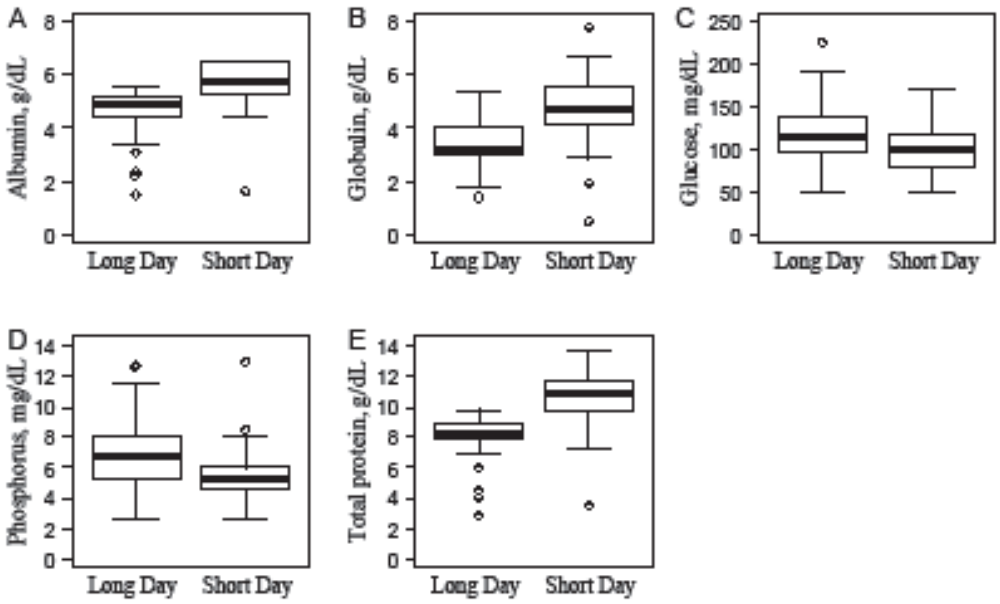


Figure 2. Medians, 25% and 75% quartiles of blood biochemical markers that were significantly different between seasons (LD: long-day season; SD: short-day season) in grey mouse lemurs.

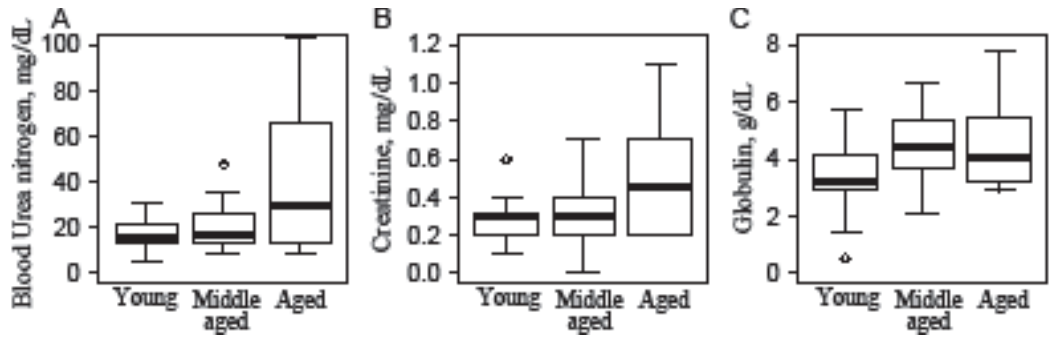


Figure 3. Medians, 25% and 75% quartiles of blood biochemical markers that were significantly different between age groups (Young animals: 1 to 3 years old; middle-aged animals: 4 to 5 years old; aged animals: 6 to 10 years old).

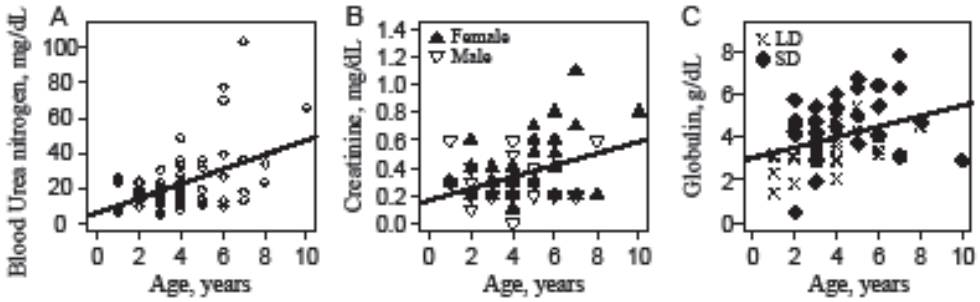


Figure 4. Statistical analysis was performed with Pearson correlation. A: Simple linear regression between blood urea nitrogen levels and age (n=77, r=0.46, p<0.001). B: Simple linear regression between creatinine levels and age (n=75, r=0.28, p<0.01). C: Simple linear regression between total blood globulin concentration and age (n=73, r=0.20, p<0.05), LD: long-day season; SD: short-day season.

Annexe B

Description des dispositifs et méthodes utilisés pour l'évaluation des performances cognitives et motrices et du comportement chez le microcèbe

I) Evaluation des capacités cognitives

Le but de l'évaluation des capacités cognitives, chaque année de vie du microcèbe, est de mettre en évidence un déclin cognitif potentiel, décrit au cours du vieillissement chez de nombreuses espèces animales dont l'Homme, et pouvant avoir une évolution rapide lors du développement de certaines pathologies neurodégénératives liées à l'âge, comme par exemple la maladie d'Alzheimer.

Il a donc fallu mettre au point des tests comportementaux devant réunir plusieurs conditions :

- facilement réalisables et préférentiellement déjà utilisés chez d'autres espèces animales pour les études comparatives
- pertinents et adaptés au microcèbe (prise en compte de l'écologie de l'animal, de la locomotion, de la sensibilité au stress…)
- permettant une phase d'habituation ou d'apprentissage relativement courte (notamment pour éviter tout risque de transfert positif/négatif d'apprentissage d'une session à l'autre)
- ne nécessitant pas obligatoirement de « récompenses » (apprentissage par renforcement), car le projet Restrikal porte sur la validation de protocoles nutritionnels dont la restriction calorique, les animaux ne peuvent donc recevoir plusieurs récompenses alimentaires au cours des tests

Trois tests ont été mis en place permettant de tester différents types de mémoire qui impliquent différentes structures cérébrales. Le premier test, dit d'alternance spontanée

(Figure 1) permet de tester la mémoire de travail sans apprentissage, le second test est adapté du labyrinthe de Barnes (Figure 2), couramment utilisé chez les rongeurs, il nécessite une phase d'habituation et d'apprentissage et fait appel à une mémoire à long terme. Il évalue la mémoire spatiale de référence puisque l'animal doit associer un contexte spatial constitué d'indices allocentriques (toujours identiques) avec la cible (sortie menant à son nichoir). Enfin le troisième test, appelé « préférence conditionnée pour un emplacement » (Figure 3), permet de tester la mémoire émotionnelle (mémoire associative). L'animal apprend à associer certains stimuli (hédoniques ou aversifs) à un emplacement particulier et à « renverser » son choix initial pour l'emplacement en faveur de l'autre emplacement.

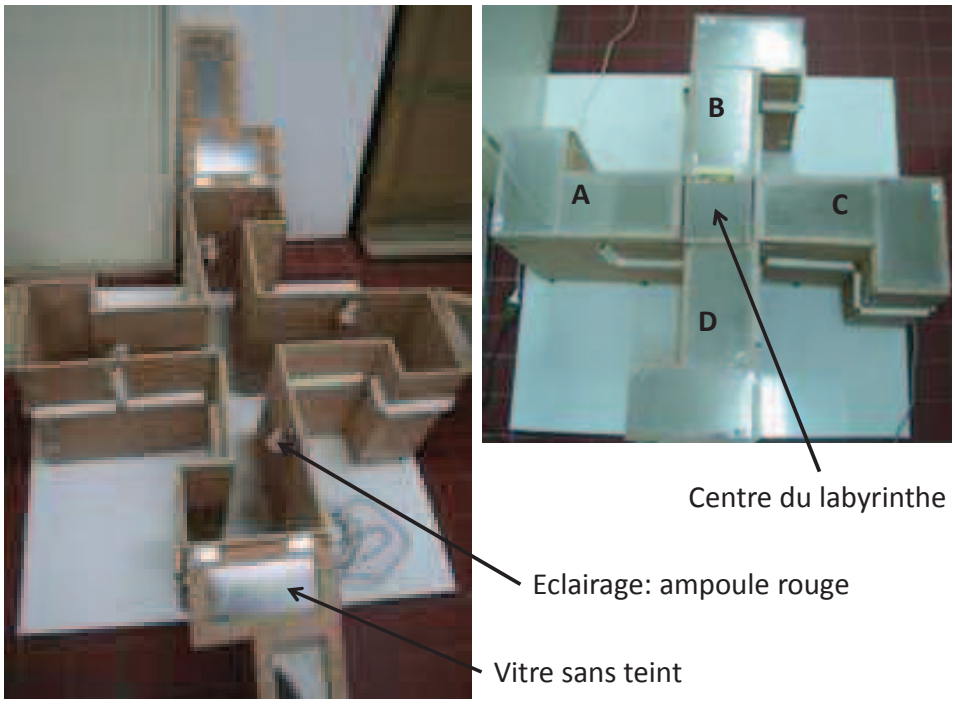


Figure 1. *Dispositif de l'alternance spontanée. Au départ l'animal est positionné au centre du labyrinthe puis est laissé en exploration libre pendant 20 minutes. L'alternance entre les différents bras (A, B, C et D) est évaluée. Le labyrinthe est recouvert de vitres sans teint pour permettre les observations des comportements exploratoires de l'animal sans que l'expérimentateur soit vu.*

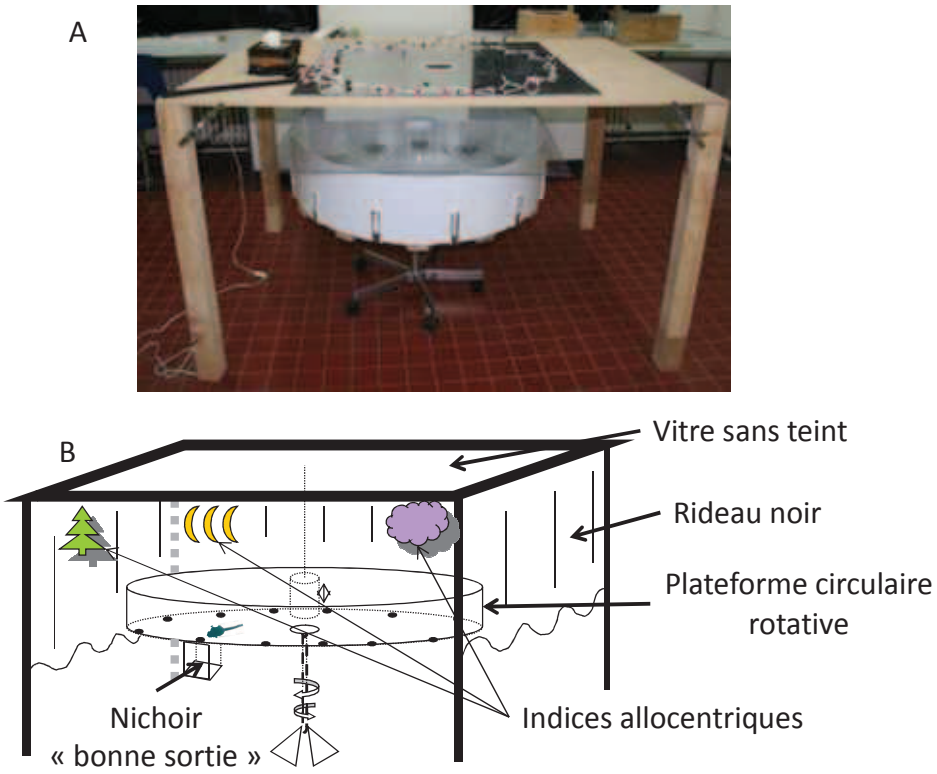


Figure 2. *Dispositif de la plateforme circulaire (adaptée du labyrinthe de Barnes). En A : photographie du dispositif. En B : schéma du dispositif.*

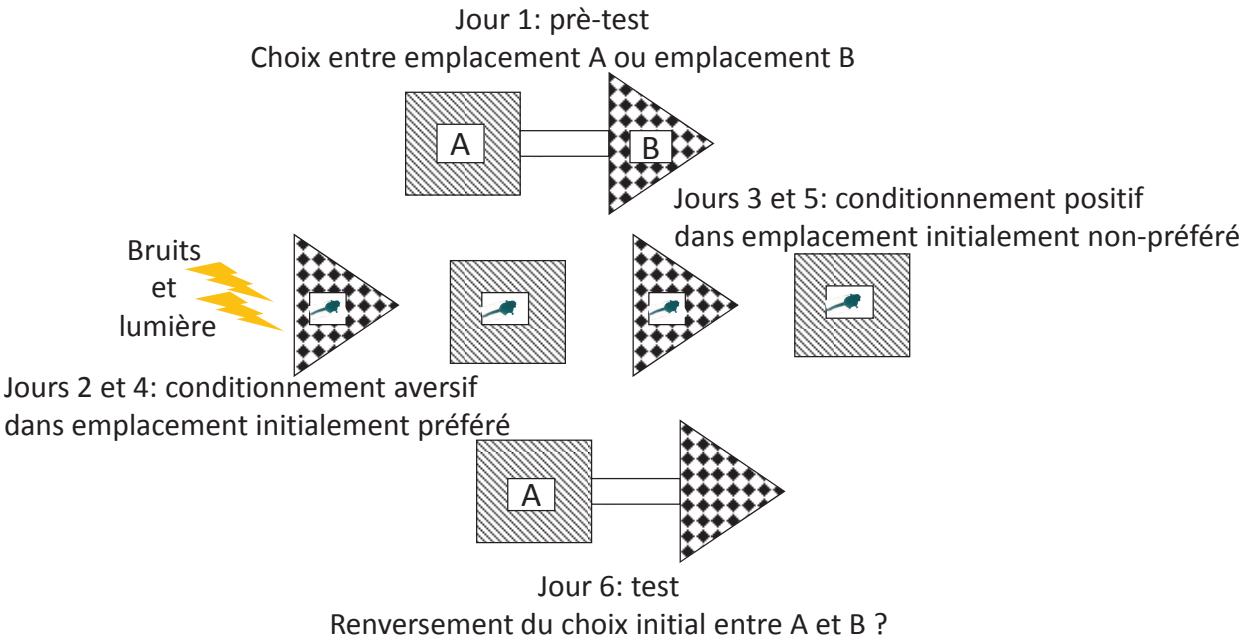


Figure 3. *Dispositif de la préférence conditionnée.*

II) Évaluation des capacités motrices

Les capacités motrices sont évaluées pour mettre en évidence un éventuel déclin locomoteur et musculaire au cours du vieillissement normal et pour compléter les conclusions issues des résultats des capacités cognitives qui requièrent des facultés physiques et motrices. Trois tests ont été mis en place : le premier est l'épreuve du saut (Figure 4). L'animal est placé dans une cage haute, dans laquelle il doit atteindre son nichoir par le seul moyen d'un saut direct (en une seule fois). Le nichoir et la tige étant placés à des hauteurs de plus en plus élevées à chaque essai successif. Ce test sollicite des capacités physiques et musculaires importantes.

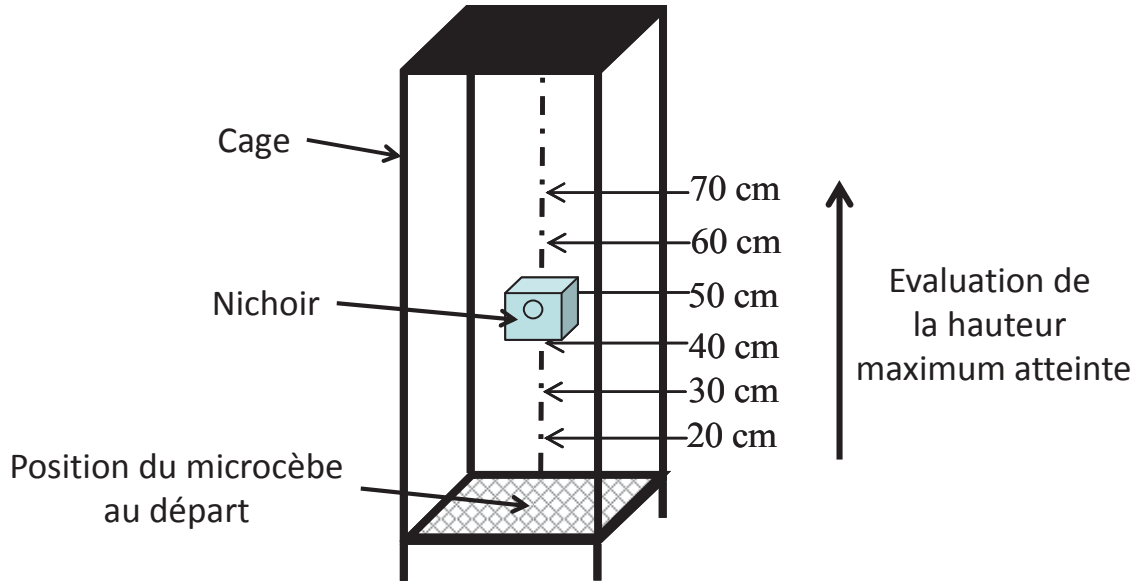


Figure 4. *Dispositif de l'épreuve du saut.*

Le deuxième test est le dispositif du Rotarod (Figure 5), couramment utilisé chez les rongeurs, ce dispositif permet d'évaluer la coordination motrice et l'endurance physique puisque l'animal doit rester le plus longtemps possible en mouvement (marche) sur un rondin mobile dont la vitesse accélère avec le temps.

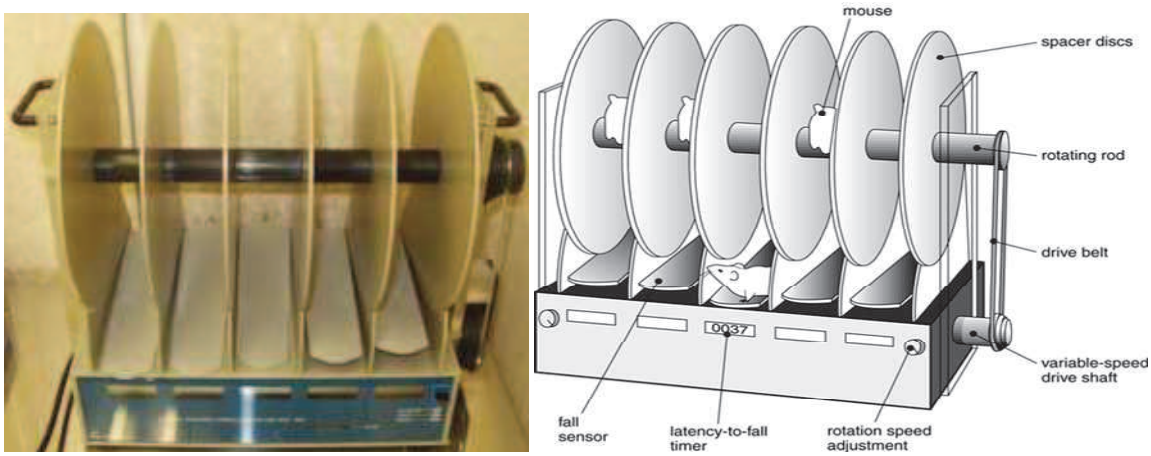


Figure 5. *Dispositif de l'épreuve du Rotarod : photographie et schéma.*

Le troisième dispositif, dit « d'équilibre » (Figure 6) évalue les capacités de coordination motrice ainsi que l'équilibre de l'animal sur un support plus ou moins « difficile » à parcourir. Chaque animal est testé sur une tige fine et rigide et ensuite sur une cordelette tendue beaucoup moins rigide que la tige. Les comportements de perte d'équilibre sont comptabilisés ; ils reflètent les stratégies adoptées par les microcèbes pour parvenir à se repositionner sur le support pour atteindre la cible (nichoir). Ceci permet de mettre en évidence un « répertoire » comportemental affiné par rapport aux deux tâches motrices précédentes que sont le saut et le Rotarod.

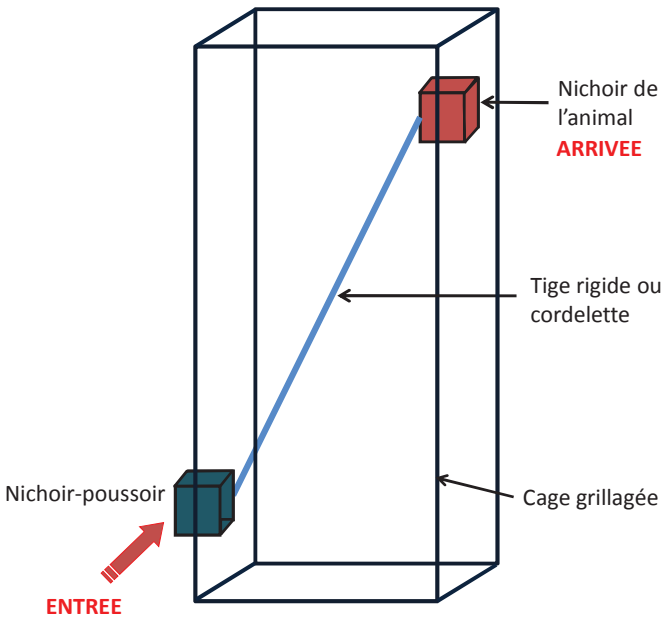


Figure 6. *Schéma du dispositif dit « d'équilibre.*

I) Evaluation de l'anxiété et du comportement exploratoire

L'évaluation de l'anxiété du microcèbe s'est effectuée au travers de deux dispositifs. Le premier est le test du champ ouvert, autrement dit de l'Open Field (Figure 7). Le dispositif, matérialisé par une enceinte de forme carrée représente un environnement « nouveau » (différent da la cage de l'animal), éclairé et qui peut être compartimenté en une zone périphérique considérée comme moins anxiogène que la zone centrale, éloignée des parois, plus anxiogène. Le parcours des animaux est enregistré et analysé grâce à un logiciel de trajectométrie VideoTrack. Ainsi, plusieurs variables de suivi sont évaluées : la latence avant le premier mouvement, la durée et la distance d'exploration, la visite de la zone centrale et/ou de la zone périphérique.

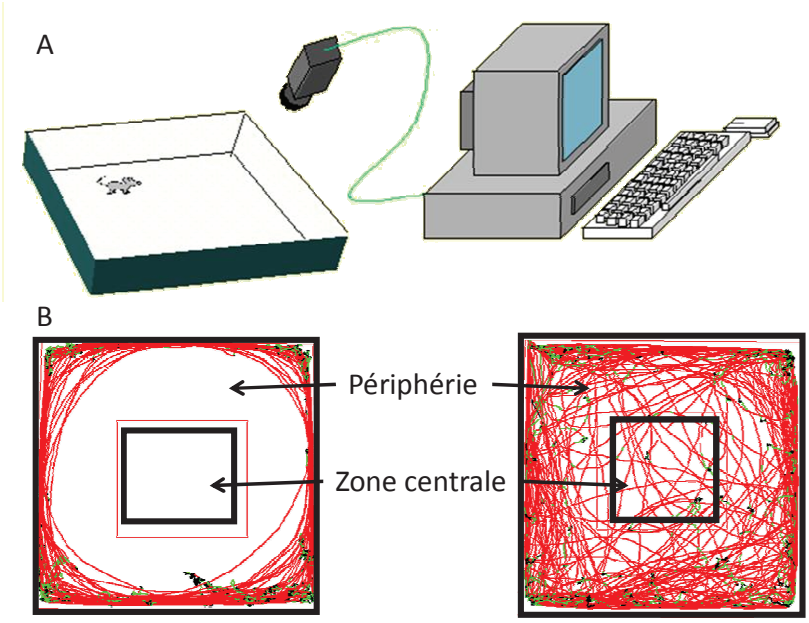


Figure 7. *En A : Schéma du dispositif complet de l'Openfield. En B : exemple de profils d'exploration par des microcèbes avec à gauche aucune visite en zone centrale et à droite plusieurs visites en zone centrale.*

Le second test utilisé est le Plus-maze (Figure 8). C'est une structure en croix avec une zone centrale débouchant sur quatre bras : deux bras ouverts et exposés à une lumière blanche ou deux bras fermés, entièrement recouvert d'un revêtement opaque et noir, moins anxiogènes pour les animaux. Ainsi l'animal a le choix entre deux environnements différents permettant à l'expérimentateur d'évaluer, en terme de proportion le temps passé dans un type de bras ou l'autre.

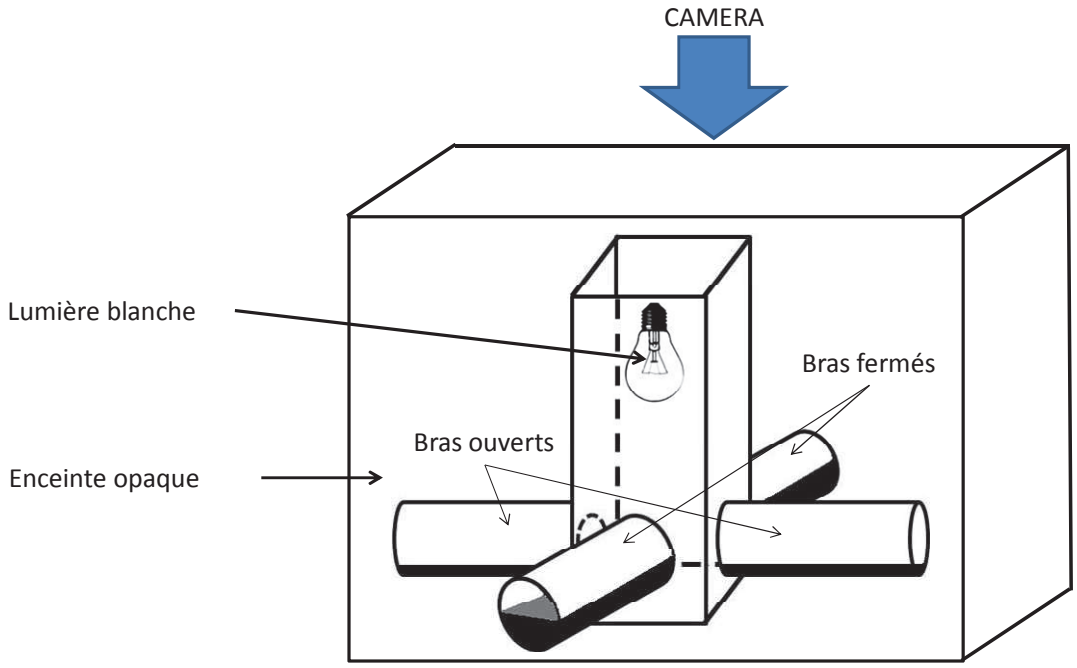


Figure 8. *Schéma du dispositif du Plus maze.*

Annexe C

Protocole expérimental pour IRM et analyses des images par Anatomist

Pour évaluer l'évolution de l'atrophie cérébrale des microcèbes, trois types d'analyse ont été menés (protocole Marc Dhenain et Jean-Luc Picq): (I) évaluation du volume de structures cérébrales cibles (ROIs) à partir de coupes repères ; (II) évaluation semi-quantitative de la quantité de liquide céphalo-rachidien (LCR) à partir de coupes repères et (III) mesures de l'épaisseur d'aires corticales spécifiques et du splénium (ImageJ). Toutes les images issues des sessions IRM ont d'abord été correctement orientées sur Anatomist (logiciel d'analyse d'image IRM) avant leur analyse.

I) Evaluation du volume de structures cérébrales cibles (ROIs)

Cinq ROIs ont été mesurées sur 5 coupes de références différentes : le *thalamus*, l'*hippocampe*, le *noyau caudé*, le *septum* et l'*amygdale*.

Sélection du Thalamus

Utilisation d'une coupe repère où le faisceau habenulo-interpédonculaire est le plus visible dans le plan coronal (Figure 1).

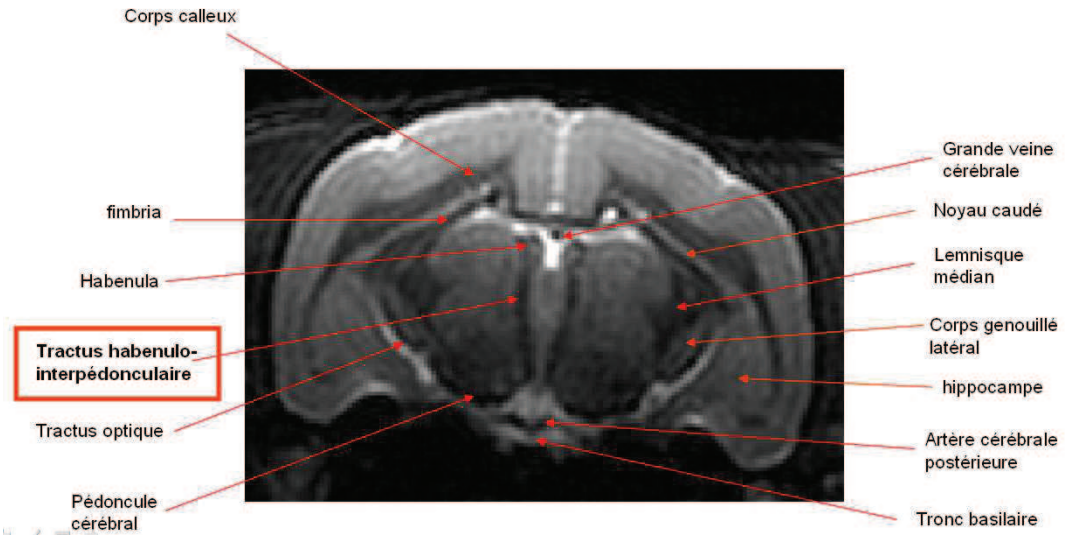


Figure 1. *Image IRM utilisée comme repère pour l'évaluation du volume du thalamus.*

A partir de la coupe repère, le volume du thalamus peut-être mesuré (Anatomist) permettant de mettre en évidence une potentielle atrophie chez certains microcèbes (Figure 2).

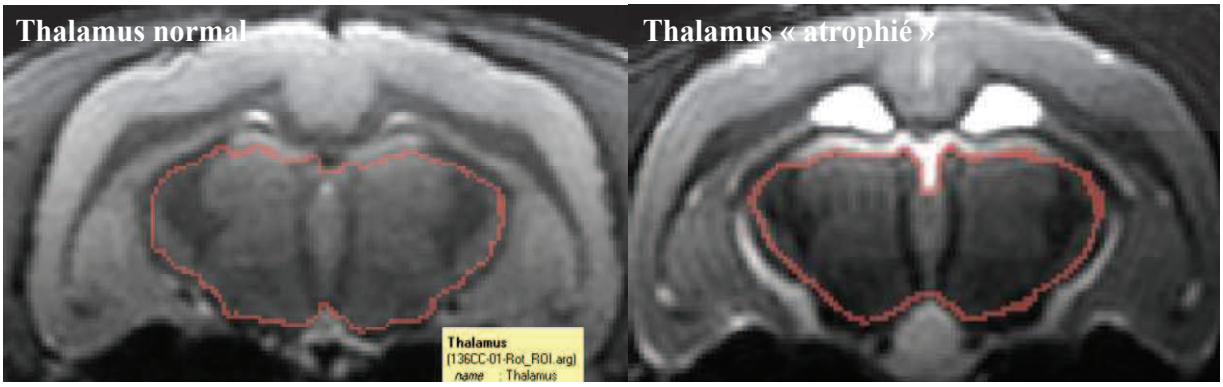


Figure 2. *Exemple de deux thalamus chez des microcèbes différents. A gauche thalamus normal et à droite thalamus atrophié.*

Sélection de l'hippocampe

Deux régions sont créées pour l'hippocampe, une région droite et une région gauche (Figure 3). Une coupe de référence est utilisée pour la mesure du volume de cette structure, il s'agit de la coupe la plus antérieure où l'hippocampe est entièrement entouré par le corps calleux.

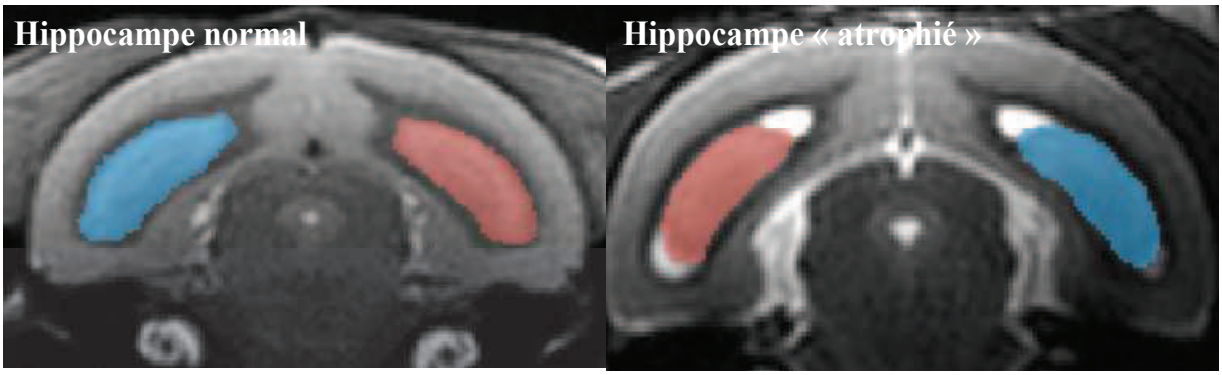


Figure 3. *Exemple de deux hippocampes chez des microcèbes différents. A gauche hippocampe (régions gauche et droite) normal et à droite hippocampe (régions gauche et droite) atrophié.*

Sélection du noyau caudé

Deux régions sont créées pour le noyau caudé, une région droite et une région gauche (Figure 4). Une coupe de référence est utilisée pour la mesure du volume de cette structure, il s'agit de

la coupe antérieure à la coupe ou la commissure antérieure est concentrée au niveau du plan sagittal.

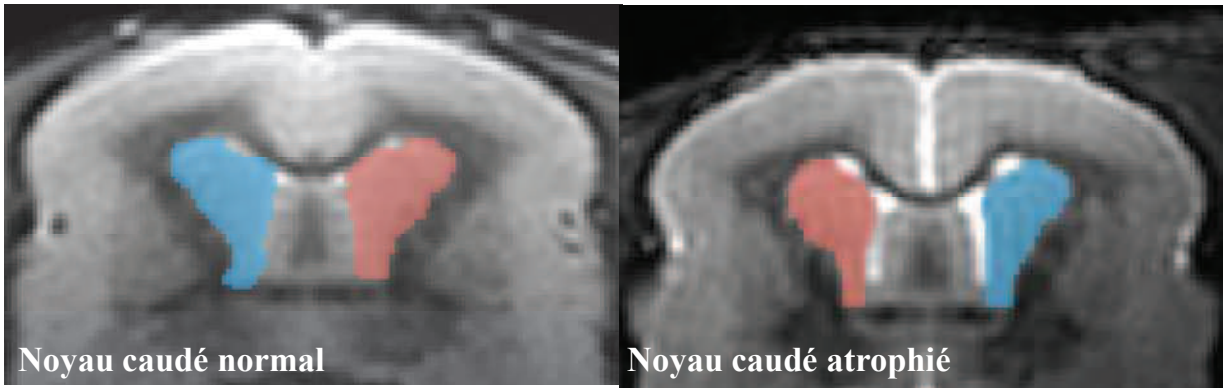


Figure 4. *Exemple de deux noyaux caudés chez des microcèbes différents. A gauche noyau caudé (régions gauche et droite) normal et à droite noyau caudé (régions gauche et droite) atrophié.*

Sélection du septum

La coupe de référence utilisée pour la mesure du volume du septum (Figure 5) est la coupe coronale la plus caudale pour laquelle la commissure antérieure passe par le plan sagittal.

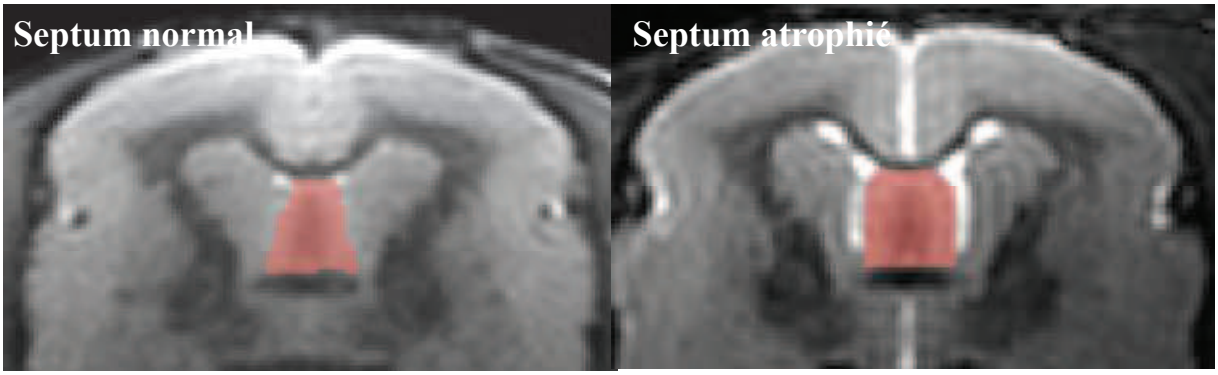


Figure 5. *Exemple de deux septum chez des microcèbes différents. A gauche septum normal et à droite septum atrophié.*

Sélection de l'amygdale

La coupe de référence utilisée pour la délimitation du volume de l'amygdale est une coupe axiale pour laquelle le chiasma optique présente une épaisseur maximum (Figure 6).

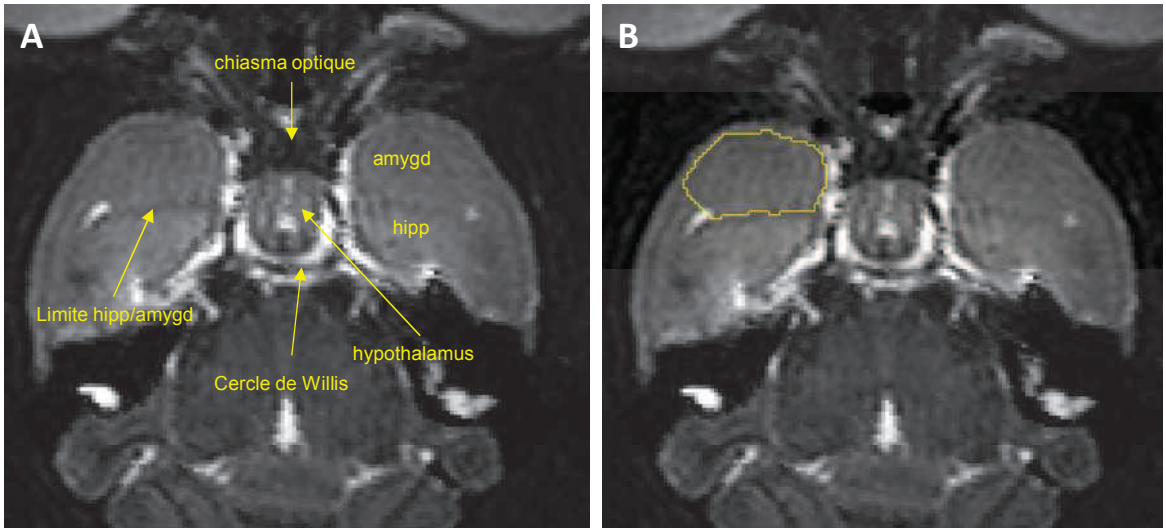


Figure 6. *En A : sélection de la coupe de référence pour la mesure du volume de l'amygdale : coupe axiale pour laquelle le chiasma optique présente une épaisseur maximale. En B : mesure du volume de l'amygdale (Anatomist).*

Mesure du volume intracrânien

Les volumes mesurés pour chaque région ROIs sont ensuite rapportés au volume intracrânien (Figure 7). La coupe de référence utilisée pour ce faire est la coupe ou le faisceau habenulo-interpédonculaire (voir Figure 1) est visible sur l'ensemble du plan coronal.

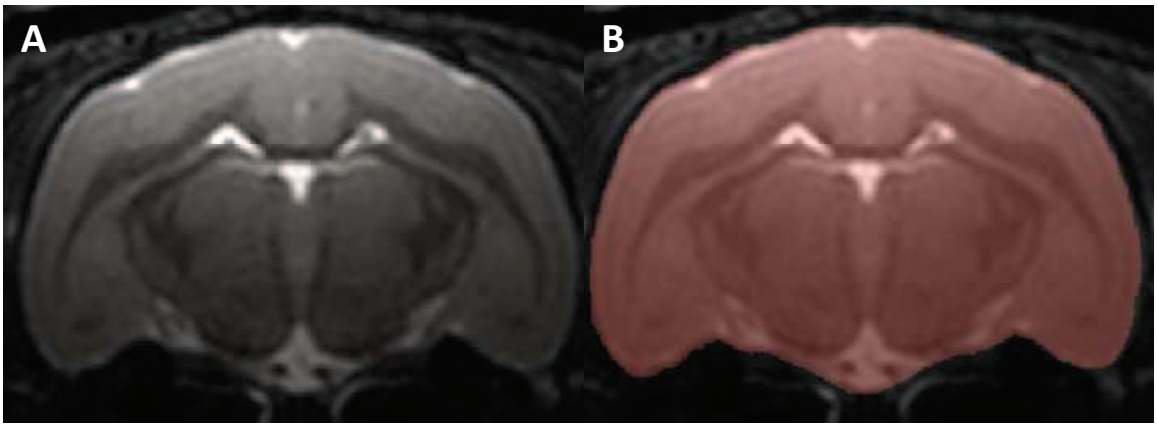


Figure 7. *En A : sélection de la coupe de référence pour la mesure du volume intracrânien. En B : mesure du volume intracrânien (en rouge) (Anatomist).*

II) Evaluation semi-quantitative de la quantité de LCR

Généralités

L'évaluation de la quantité de LCR est effectuée grâce à une grille de scores allant de zéro à trois. Des coupes repères (numérotées de R1 à R10 de la plus antérieure à la plus postérieure) ont été utilisées pour faire 13 mesures semi-quantitatives d'atrophie (dont 3 mesures effectuées sur R5 et 2 sur R7). Dans le cas de région cérébrale latéralisée, un score indépendant a été attribué à chaque région.

Choix des 10 coupes repères et grille de scores

Des critères ont été mis en place pour sélectionner les coupes repères et pour chaque mesure de LCR à faire, les images de référence correspondant aux scores de zéro à trois (Figure 8). Le score zéro est attribué lorsque la région étudiée ne présente pas d'atrophie. Le score 1 est attribué lorsque peu de LCR est observable. Le score 2 est attribué lorsque le LCR est visible, il y a donc atrophie mais celle-ci n'est pas étendue. Le score 3 est attribué lorsque le LCR est visible et l'atrophie est étendue. Ces grilles de scores sont réalisées pour chaque coupe repère et servent ensuite de référence pour comparer les coupes de cerveau obtenues lors de l'IRM des microcèbes du projet Restrikal.

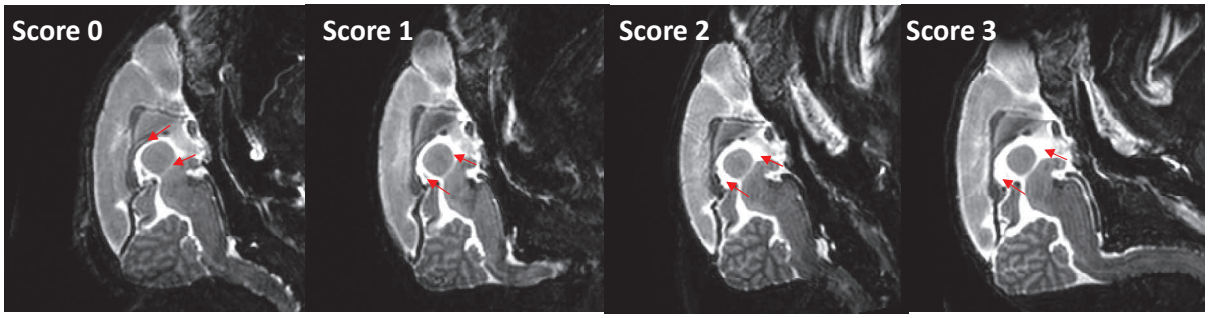


Figure 8. *Exemple de l'attribution de scores (de 0 à 3 : normal à atrophie étendue) au niveau du thalamus (coupe sagittal). Les flèches rouges indiquent l'évolution de l'étendue du LCR autour du thalamus.*

III) Mesures de l'épaisseur d'aires corticales et du splénium

La mesure de l'épaisseur du cortex s'effectue grâce au logiciel Image J. Le choix des coupes est réalisé stratégiquement par rapport à un atlas architectonique (Figure 9), au niveau de 5

coupes corticales (substance grise) et une coupe pour le splénium. Sur ces 5 coupes repères, 11 aires corticales sont balayées.

Le détail des 6 coupes est le suivant :

- *Coupe 1*: Coupe la plus rostrale pour laquelle le corps calleux passe dans le plan sagittal : épaisseur des cortex 6 et cortex 24
- *Coupe 2* : Première coupe après la séparation du tractus mamillo-thalamique en 2 parties séparées: épaisseur des cortex 4, cortex 23 et cortex 28
- *Coupe 3* : Coupe la plus caudale pour laquelle le corps calleux passe dans le plan sagittal (en formant une barre uniforme et large) : épaisseur des cortex 5, cortex 7 et cortex 21
- *Coupe 4* : Coupe la plus rostrale lorsque les colliculi supérieurs disparaissent : épaisseur des cortex 18 et cortex 22
- *Coupe 5* : Première coupe lorsque les colliculi supérieurs sont masqués par le cervelet : épaisseur du cortex 17
- *Coupe 6 (épaisseur du splénium)* : Coupe pour laquelle le splénium atteint son épaisseur maximale (correspond à la dernière coupe où la commissure postérieure est encore visible) : épaisseur du splénium.

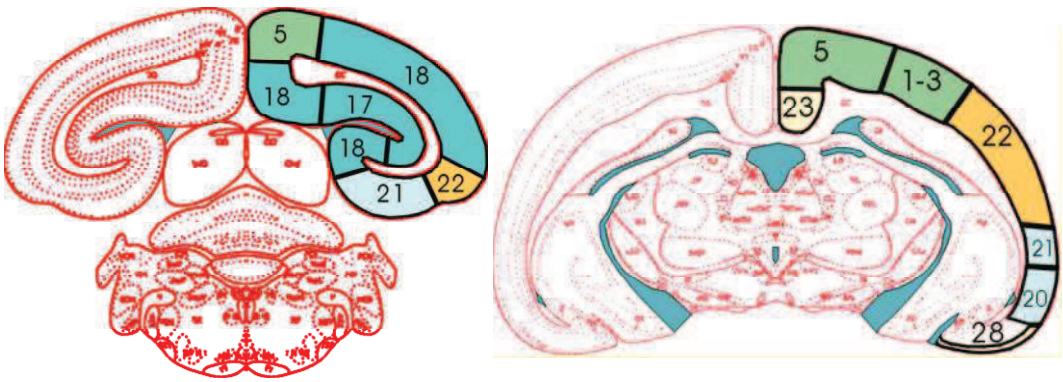


Figure 9. *Exemple de coupes coronales (sur deux plans antéropostérieurs différents) issue d'un atlas architectonique pour le choix des zones corticales à mesurées. Chaque numéro correspond à un cortex différents.*

Annexe D

Suivi de la température corporelle du microcèbe par thermographie infrarouge

Le suivi de la température corporelle chez le microcèbe peut être réalisé à l'aide de différentes méthodes : implant télémétrique abdominal, collier émetteur, thermographie infra-rouge, sonde thermocouple anale. Nous avons opté pour le suivi par thermographie à infra-rouge pour son aspect non invasif, qui ne nécessite pas de manipulation répétée de l'animal et qui permet des mesures continues sur une période choisie.

Protocole expérimental : des caméras thermiques de type B-Cam et A320 (Thermofisher, France Infrarouge) ont été utilisées pour le suivi de la température corporelle. La caméra était positionnée au dessus de la cage de l'animal, au niveau de son nichoir (dépourvu de couvercle). Ce système a permis l'enregistrement continu (du lundi au vendredi) de la température corporelle réfléchie par l'animal (Figure 1).

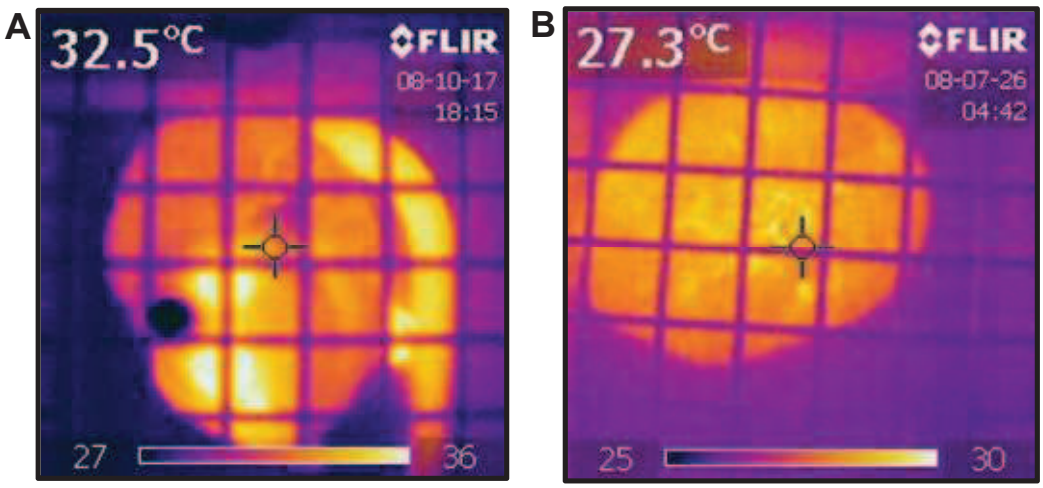
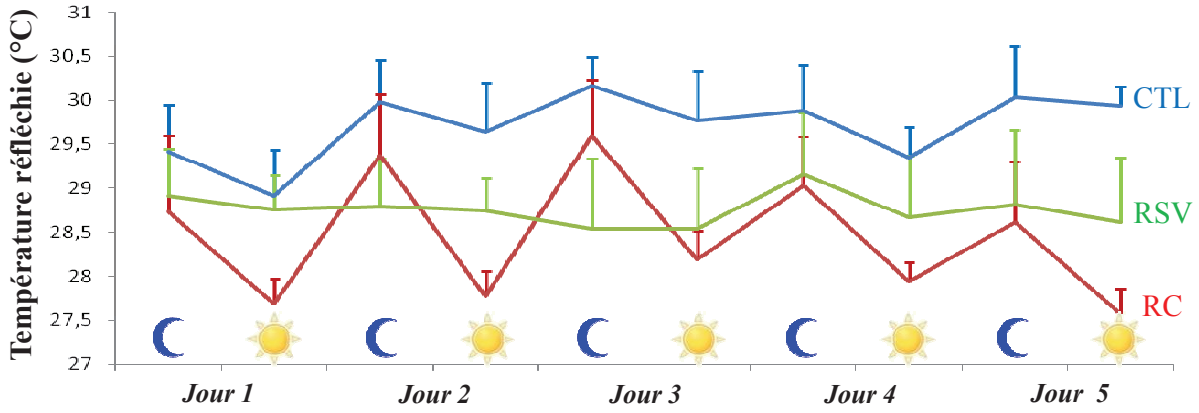


Figure 1. *Image de thermographie infrarouge chez le microcèbe. A. un microcèbe éveillé présentant une température réfléchie de 32,5°C. B. un microcèbe en torpeur, présentant une température de 27,3°C.*

Les vidéos obtenues ont été traitées avec le logiciel Thermacam Researcher (FLIR Systems Inc, Oregon, USA). Le logiciel extrait les températures sur un pas de temps choisi (pour notre étude, toutes les 5 min) pour les 5 jours d'enregistrement puis les convertit en fichier Excel. Nous avons ensuite la possibilité de retravailler les profils de température en fonction de la présence/absence de l'animal dans son nichoir, ou d'un moment précis de son cycle circadien (température de nuit ou de jour).

Résultats : Ces mesures ont été réalisées en milieu de jours courts ou en fin de jours longs (comme les mesures de l'activité locomotrice spontanée). Les premiers résultats sont



représentés ci-dessous pour n= 4 CTL, n= 3 CR et n= 4 RSV, uniquement en jours longs.

Figure 2. *Profil de la température corporelle chez les microcèbes CTL (contrôles), RC (restreints) et RSV (supplémentés en resvératrol) suivis par thermographie infrarouge. (Chaque journée d'enregistrement compte une température moyenne de nuit (lune) et une température moyenne de jour (soleil)).*

Les premières données indiquent une diminution de la température corporelle (Tc) chez les animaux restreints par rapport aux animaux du groupe témoin tandis que les températures relevées chez les animaux RSV ne sont pas différentes des animaux contrôles.
Alors que durant la phase nocturne (phase active) la Tc ne diffère pas de celle des CTL, durant la phase diurne la Tc des animaux restreints est réduite d'environ 1,5°C en moyenne. Ces premiers résultats apportent des indices quant à une réduction de la Tc lors de la RC d'une part et sur la plasticité phénotypique des animaux restreints, à savoir la capacité de moduler la température minimale et la durée de la torpeur.

Annexe E

Analyse de la biodisponibilité et de la distribution tissulaire du resvératrol

L'analyse de la biodisponibilité et de la distribution tissulaire du resvératrol chez les microcèbes est actuellement en cours.

Une des premières étapes a consisté en la mesure de la cinétique du resvératrol et des ses dérivés dans le plasma de microcèbes.

Protocole expérimental : 20 microcèbes adultes (3-4ans) de l'élevage de Brunoy ont été utilisés pour ces mesures. 4 groupes de n=5 microcèbes mâles en jours longs ont été répartis comme suit: 1 groupe contrôle pour la mesure baseline du resvératrol et de ses composés (t0), 1 groupe pour la mesure à t+1h ", 1 groupe pour la mesure à t+6h et 1 groupe pour la mesure à t+24h. Une administration d'une dose de 20mg de resvératrol a été administrée pour les groupes t+1h, t+6h et t+24h.

Des prélèvements sanguins ont été effectués au niveau de la veine saphène, sans anesthésie afin de recueillir 150 à 200µL de sang.

Une séparation par UPLC (C18) / MS-MS (Q-Tof) « Synapt », matériel présent sur le site de la faculté de pharmacie de Paris Descartes sur la plateforme C-TAC (EA 4463, O Laprévote, analyste référent : MC Menet) a été choisie et réalisée par l'équipe du Dr. Charles-Henry Cottard (Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques). Les résultats ont été comparés à ceux préalablement établis chez des souris.

Résultats : Les métabolites principaux sont, par ordre croissant de concentrations, le 3 glucoronidé (200 µmol/L) > le 3 sulfaté (40 µmol/L) > le resvératrol (6 µmol/L) > le 4'glucoronidé = le 4 sulfaté/glucoronidé (1 µmol/L). D'autres métabolites dont un sulfo-glucurono- resvératrol ont pu être détectés mais n'ont pas été quantifiés. En revanche, le picéatannol, un dérivé tétrahydroxylé, ainsi que le dé-hydroresvératrol, parfois décrits dans la littérature chez l'humain, n'ont pas été détectés dans le plasma des microcèbes.

Le profil cinétique de ces métabolites est légèrement différent de celui de la souris, par ordre croissant de concentrations : 3 glucoronidé (174 µmol/L) > le resvératrol (25 µmol/L) > le 3 sulfaté (13 µmol/L) > 4'glucoronidé = le 4 sulfaté/glucoronidé (<1 µmol/L).

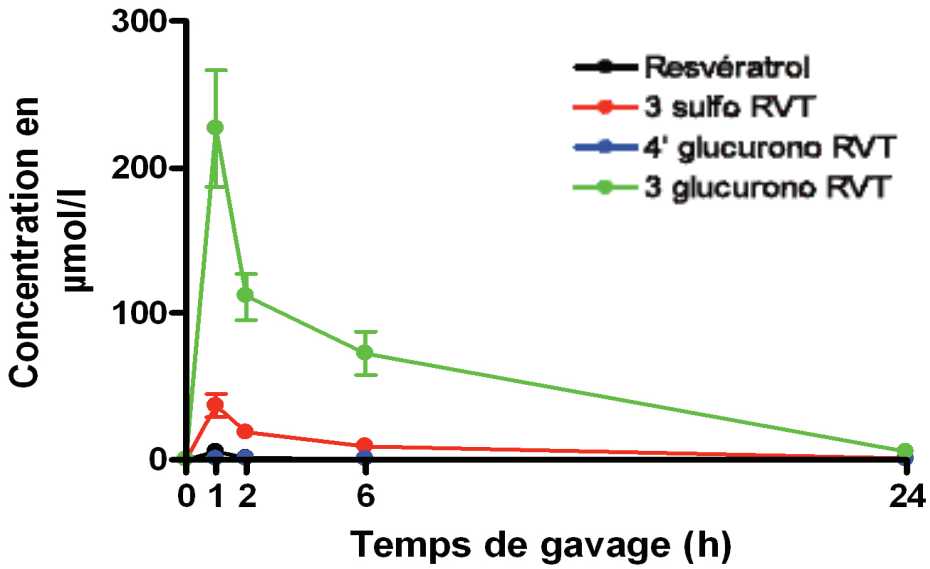


Figure 1. *Cinétique plasmatique du resvératrol et de ses dérivés dans le plasma des microcèbes à t0, t+1h, t+6h et t+24h.*

Perspectives : Le sacrifice de 4 microcèbes mâles en saison de jours longs (1 contrôle, 1 aigu après 1h (gavage), 1 aigu après 24h (gavage) et 1 chronique après 2 mois de supplémentation) a été réalisé et les analyses sont actuellement en cours. Les mesures émanant de l'animal contrôle pourraient apporter des informations supplémentaires car les animaux de l'élevage de Brunoy reçoivent une part de fruit frais (banane et pomme) très régulièrement (au moins tous les deux jours). Ceci permettrait donc de connaître la biodisponibilité en resvératrol et ses composés dérivés d'un animal qui en reçoit « naturellement » via la portion de fruits frais et de la comparer à une supplémentation telle qu'opérée dans l'étude Restrikal.

Abstract

Thesis subject: Impact of a chronic calorie restriction or a potential mimetic, the resveratrol, on the evolution of biomarkers of aging and on longevity in a primate (*Microcebus murinus*).

Nowadays moderate and chronic calorie restriction (CR); is the only non-genetic intervention known to slow the onset of age-related diseases and to increase longevity in several animal species. Resveratrol (RSV), a natural compound belonging to the polyphenols group, has therapeutic properties and is a promising candidate as CR effects mimetic. To assess the impact of such long-term nutritional protocols, a longitudinal study was conducted on a cohort of 53 males grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*), a relevant primate model for normal and pathological aging research as regards to its high longevity in captivity, up to 12 years. Since the integration of the animals in the study (3 years old) to the current status of the project (8 years of age), physiological and behavioral parameters were assessed regularly in the cohort divided into three groups: a group submitting to a -30% CR and a group supplemented with RSV (200 $mg.kg^{-1}.day^{-1}$), compared to a control group (CTL). With age, disturbances appeared in CTL mouse lemurs: decreased insulin sensitivity, accumulation of cellular damage, motor and cognitive decline associated with particular type of memory and a decline of certain predictive biomarkers of aging in this species. CR has improved insulin sensitivity and limited the accumulation of markers of oxidative stress, it has not resulted in improved cognitive abilities but in a decreased anxiety, improved motor performances and an increased spontaneous locomotor activity. CR also induced an adaptive metabolic response with body weight loss without lowering energy expenditure, lower hormone levels of IGF-1 and testosterone, supporting a probable trade-off between reproduction and survival. RSV mimicked some of the beneficial effects demonstrated in CR. However, it has improved the spatial memory task, which was not observed in restricted animals. RSV also showed opposite effects to those of CR, as maintained body weight and hormone levels compared to CTL, an increase in energy expenditure and in testosterone levels during the long day's season. Finally, the current survival data are promising; less than 50% of the CTL animals survived, while more than 50% of CR and RSV animals are still alive, with in addition a mean age at death about 1 year higher compared with CTL animals. Despite heterogeneous, but yet beneficial effects, CR and RSV were able to slow the appearance of some intrinsic age-related declines and to improve the lemurs' survival, supporting the hypothesis that these effects may be mediated by different mechanisms achieving the same positive outcomes including enhanced life expectancy. These evidences are a real tool for the future understanding of the mechanisms underlying the aging process but also of cellular regulatory pathways that are involved in long term CR and RSV treatment in a primate.

Key words: calorie restriction – resveratrol – non human primate – aging – lifespan - grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) – energy balance – behavior.

Résumé

Sujet de thèse : Impact d'une restriction calorique chronique ou d'un mimétique potentiel, le resveratrol, sur les marqueurs du vieillissement et sur la longévité chez un primate, le microcèbe (*Microcebus murinus*).

Aujourd'hui la restriction calorique modérée et chronique (RC) est la seule intervention non génétique capable de ralentir l'apparition de pathologies liées à l'âge et d'accroître la longévité chez plusieurs espèces animales. Le resvératrol (RSV), un composé appartenant au groupe des polyphénols, présente des propriétés thérapeutiques intéressantes et constitue un candidat prometteur comme mimétique des effets d'une RC. Afin d'évaluer l'impact de tels protocoles nutritionnels à long terme, une étude longitudinale a été menée sur une cohorte de 53 mâles microcèbes (*Microcebus murinus*), modèle primate pertinent pour les recherches sur le vieillissement normal ou pathologique au vue de sa longévité maximale de 12 ans en captivité. Depuis l'intégration des animaux dans l'étude (3 ans d'âge) à l'avancement actuel du projet (8 ans d'âge), des paramètres physiologiques et comportementaux ont été évalués régulièrement au sein de la cohorte, partagée en trois groupes: un groupe soumis à une RC (-30%) et un groupe supplémenté en RSV (200 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$), comparés à un groupe contrôle (CTL). Avec l'âge, chez les microcèbes CTL, des perturbations sont apparues : diminution de la sensibilité à l'insuline, accumulation de dommages cellulaires, déclin moteur et cognitif (mémoire spatiale de reférence) et déclin de certains marqueurs prédictifs du vieillissement chez cette espèce. La RC a permis une amélioration de la sensibilité à l'insuline et a limité l'accumulation de certains marqueurs du stress oxydant, elle n'a pas entraîné d'amélioration des capacités cognitives, mais a diminué l'anxiété, amélioré les performances motrices et augmenté l'activité locomotrice spontanée. La RC a aussi induit une réponse adaptative métabolique avec une perte de masse corporelle sans réduire les dépenses énergétiques, un abaissement des taux hormonaux d'IGF-1 et de la testostérone suggérant un compromis entre reproduction et survie. Le RSV a mimé une partie des effets bénéfiques démontrés sous RC. Cependant il a permis une amélioration de la mémoire spatiale de travail, absente chez les animaux restreints. Le RSV a également montré des effets opposés à ceux de la RC comme un maintien de la masse corporelle et des taux d'hormones par rapport aux CTL, une augmentation des dépenses énergétiques et des niveaux de testostérone pendant la période de jours longs. Finalement les données de survie actuelles sont prometteuses ; moins de 50% de l'effectif de départ des animaux CTL a survécu, alors que plus de 50% des animaux RC et RSV sont encore vivants, présentant de surcroît un âge moyen à la mort plus élevé d'environ 1 an par rapport aux CTL. Malgré des effets hétérogènes et pourtant bénéfiques, la RC et le RSV sont capables de ralentir l'apparition de certains déclins intrinsèques au vieillissement et d'améliorer la survie des microcèbes, soutenant l'hypothèse selon laquelle ces effets pourraient être induits par des mécanismes différents mais permettant d'atteindre les mêmes issues favorables notamment au niveau de l'espérance de vie. Ces résultats constituent un véritable outil pour la compréhension future des mécanismes sous-jacents au processus du vieillissement mais aussi des voies de régulation cellulaires mises en jeu par la RC et le RSV à moyen et long terme chez un primate.

Mots clés : restriction calorique – resvératrol – primate non-humain – vieillissement – longévité - Microcèbe (*Microcebus murinus*) – métabolisme – comportement.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES