



HAL
open science

Étude histologique de nothobranchius furzeri : un nouveau modèle animal dans l'étude du vieillissement comparé

Manon Lepori

► **To cite this version:**

Manon Lepori. Étude histologique de nothobranchius furzeri : un nouveau modèle animal dans l'étude du vieillissement comparé. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04465957

HAL Id: dumas-04465957

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04465957v1>

Submitted on 19 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI : UN NOUVEAU MODÈLE ANIMAL DANS L'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT COMPARÉ

THÈSE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

*Présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse*

Par

Manon LEPORI

Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRÉSIDENT :

M. Yves ROLLAND

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie PRIYMENKO

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉ :

M. Jean-Philippe PRADERE

Chargé de recherche à l'institut RESTORE, INSERM

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse,

À Monsieur le Professeur Yves ROLLAND

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Praticien hospitalier – *Service Gériatrie*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

En témoignage de mes hommages respectueux

À Madame le Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie – Anatomie Pathologique

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse et de me confier ce sujet,

*Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance
et de mes sincères remerciements pour votre disponibilité,
vos conseils et votre implication au cours de l'élaboration de ce travail.*

À Madame le Professeur Nathalie PRIYMENKO

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Alimentation et Botanique Appliquée

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

*Recevez mes plus sincères remerciements
pour votre disponibilité.*

À Monsieur Jean-Philippe PRADERE

Chercheur INSERM à l'institut RESTORE, Toulouse

Équipe METABOLINK

Qui m'a fait l'honneur d'accepter l'invitation à ma soutenance de thèse,

*En témoignage de ma profonde reconnaissance
pour votre aide, votre disponibilité et vos conseils,
sincères remerciements.*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
LISTE DES ANNEXES	15
INTRODUCTION.....	16
PARTIE I - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI	19
A. Taxonomie.....	19
1. Classe : Actinoptérygiens.....	19
2. Ordre : Cyprinodontiformes	20
3. Famille : Notobranchiidae	21
4. Genre : Nothobranchius	22
B. Habitat, répartition et organisation des populations	22
1. Habitat de <i>Nothobranchius furzeri</i> , répartition et contexte historique.....	22
2. Détermination du sexe et variation des sex-ratio dans la nature	27
3. Alimentation.....	27
C. Cycle de vie	27
1. Système de reproduction	27
2. Cycle de vie.....	28
II. PLACE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI DANS L'ÉTUDE DU	
VIEILLISSEMENT	31
A. Le vieillissement et son étude	31
1. Définition du vieillissement	31

2.	Les mécanismes cellulaires du vieillissement.....	32
3.	Le vieillissement à l'échelle des tissus.....	38
A.	LES MODELES D'ETUDE CLASSIQUES ET LEURS LIMITES	40
4.	Les modèles classiques invertébrés.....	40
5.	Les modèles classiques vertébrés.....	41
B.	Intérêt de <i>Nothobranchius furzeri</i> dans l'étude du vieillissement	42
1.	Des caractéristiques biologiques d'intérêt.....	42
2.	Particularité du modèle en captivité.....	45
	PARTIE II - EXPÉRIMENTALE.....	46
I.	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	47
A.	Les gérosiences, le consortium INSPIRE et l'IHU HealthAge.....	47
B.	Les cohortes au cœur des études fondamentales et translationnelles.....	48
C.	Objectifs de la construction d'un atlas.....	50
II.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
A.	Élevage et prélèvement des poissons au sein de l'institut RESTORE.....	51
B.	Population d'étude	52
1.	Animaux inclus dans l'atlas	52
2.	Animaux exclus de l'atlas	53
C.	Réalisation des coupes de <i>Nothobranchius furzeri</i>.....	54
1.	Fixation des échantillons.....	54
2.	Décalcification	54
3.	Découpe.....	55
4.	Coloration.....	59
D.	Traitement de l'image.....	60

III. ATLAS HISTOLOGIQUE PAR SYSTÈMES	61
A. Anatomie générale.....	61
B. Tégument.....	62
1. Épiderme	62
2. Derme et hypoderme	63
C. Système cardio-vasculaire	65
1. Cœur	65
2. Artères	66
3. Veines.....	66
4. Vaisseaux lymphatiques.....	66
D. Système respiratoire.....	68
1. Arc branchial	68
2. Filaments branchiaux (lamelles secondaires ou branchiales)	68
3. Pseudobranchies	71
E. Système digestif	72
1. Tube digestif.....	72
2. Foie.....	77
3. Pancréas.....	79
F. Système hémato-lymphoïde	83
1. Tissu hématopoïétique rénal.....	83
2. Rate.....	85
3. Thymus.....	86
G. Système reproducteur	88
1. Gonades mâles.....	88
2. Gonades femelles	91
H. Système urinaire	95
1. Reins.....	95
2. Glomérules	95
3. Tubes et système collecteur.....	96

I. Système musculosquelettique	99
1. Squelette axial	99
2. Os et cartilage.....	99
3. Corde	101
4. Muscles.....	103
J. Vessie natatoire.....	105
K. Œil.....	107
1. Tunique externe ou tunique fibreuse	107
2. Tunique moyenne ou uvée	107
3. Tunique interne ou rétine	108
4. Le cristallin.....	108
L. Système nerveux	111
1. Cerveau.....	111
2. Moelle spinale	115
IV. LAMES NUMERIQUES ANNOTEES SUR LA PLATEFORME DE MICROSCOPIE VIRTUELLE	116
DISCUSSION	121
CONCLUSION.....	124
BIBLIOGRAPHIE.....	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des populations de Cyprinodontiformes dans le monde en 1981 (Parenti 1981).

Figure 2 : Proposition d'arbre phylogénétique de la super-famille des Aplocheiloidei (Reichard 2015)

Figure 3.1. : Situation géographique et climat de l'habitat naturel des *Nothobranchius* (d'après Valenzano et al. 2015)

Figure 3.2. : Localisation des habitats de *N. furzeri* (Terzibasi et al. 2008)

Figure 4 : Exemple d'habitat propice au développement de *N.furzeri* en (a) saison des moussons et en (b) saison aride, adapté de Terzibasi Tozzini, Cellerino 2020.

Figure 5: Photos de *N. furzeri* mâle adulte avec phénotype queue rouge (A), mâle adulte avec phénotype queue jaune (B) et femelle adulte (C) d'après Cellerino, Valenzano, Reichard 2016.

Figure 6 : Développement embryonnaire et phases de diapause chez *N. furzeri* (Platzer, Englert 2016)

Figure 7 : Schéma du cycle de vie de *N. furzeri* adapté de Cellerino, Valenzano, Reichard 2016.

Figure 8: Interconnexion des mécanismes biologiques du vieillissement (López-Otín et al. 2013)

Figure 9 : Graphique représentant les durées de vie médianes et maximales des modèles animaux utilisés dans les études sur le vieillissement comparé à l'Homme (Hu, Brunet 2018)

Figure 10 : Tableau récapitulatif des différences et similarités rencontrées entre les différents animaux de laboratoire utilisés en tant que modèles dans l'étude du vieillissement comparé (Hu, Brunet 2018)

Figure 11 : Tableau récapitulatif des poissons inclus dans l'étude.

Figure 12 : Tableau récapitulatif des poissons exclus de l'étude et des motifs d'exclusion.

Figure 13 : Dessin de l'anatomie topographique de *N. furzeri* et représentation schématique des plans de coupe

Figure 14 : Photographie légendée indiquant la topographie systémique générale chez *N.furzeri* sur une vue de profil (Hu, Brunet 2018)

Figure 15 : Diagramme schématique des couches tégumentaires chez *N.furzeri* (Roberts, Ellis 2012)

Figure 16 : Schéma de l'anatomie du cœur des téléostéens en coupe sagittale (Farrell, Pieperhoff 2011)

Figure 17 : Représentation schématique de deux segments d'arcs branchiaux adjacents (Roberts, Ellis 2012).

Figure 18: Diagramme du corpuscule rénal chez les téléostéens (Perry 2011)

Figure 19 : Dessin schématique des tubules et tubes rénaux chez la truite, similaire à celui des autres poissons téléostéens (Perry 2011).

Figure 20 : Représentations de l'anatomie général du cerveau de *N. furzeri* en vue dorsale

Figure 21 : Visuel sur Cytomine d'un cœur de *N. furzeri*

Figure 22 : Visuel sur Cytomine d'un œil de *N. furzeri*

Figure 23 : Visuel sur Cytomine des voies uro-génitales de *N. furzeri*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Illustration 1 : Coupe longitudinale de *N. furzeri* (mâle de 1 mois), partie ventrale légendée indiquant la topographie viscérale générale (HE).

Illustration 2 : Coupes longitudinales de tégument de *N. furzeri* d'un mâle de 1 mois, d'une femelle de 3 mois et d'un mâle de 6 mois (HE).

Illustration 3 : Cœur de *N. furzeri* en coupe longitudinale, femelle de 1 mois, observé au microscope optique (HE).

Illustration 4 : Cavités branchiales de *N. furzeri*, mâle de 1 mois, en coupe longitudinale (HE)

Illustration 5 : Coupe longitudinale d'un arc branchial de *N. furzeri* femelle de 7 mois (HE).

Illustration 6 : Lame branchiale de *N. furzeri* femelle de 7 mois en coupe longitudinale à fort grossissement (HE).

Illustration 7 : Coupe longitudinale de pseudobranchie de *N. furzeri* mâle de 1 mois, à faible grossissement et à fort grossissement (HE).

Illustration 8 : Histologie topographique des segments proximaux du tube digestif chez *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE).

Illustration 9 : Coupe longitudinale du dents *N. furzeri* femelle de 5 mois (HE).

Illustration 10 : Coupe longitudinale du pharynx de *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE).

Illustration 11 : Coupe longitudinale du segment intestinal et de sa paroi chez *N. furzeri* (mâle, 1 mois) (HE).

Illustration 12 : Coupe longitudinale du foie et de la vésicule biliaire de *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE).

Illustration 13 : Vue rapprochée d'un amas de cellules pancréatiques exocrines intra-hépatique, femelle de 7 mois (HE).

Illustration 14 : Histologie topographique des ilots de Langerhans chez *N. furzeri* mâle de 7 mois en vue générale et rapprochée (HE).

Illustration 15 : Multiples ilots de pancréas endocrine et pancréas exocrine diffus chez *N. furzeri* mâle de 5 mois et vue rapprochée du pancréas exocrine au sein du tissu adipeux (HE).

Illustration 16 : Vue à fort grossissement du tissu hématopoïétique du rein de *N. furzeri* mâle de 3 mois en coupe longitudinale (HE).

Illustration 17 : Vue générale de la rate de *N. furzeri*, mâle de 1 mois, en coupe longitudinale (HE).

Illustration 18 : Vue depuis la topographie générale et vue rapprochée du thymus de *N. furzeri* femelle de 7 mois en coupe longitudinale (HE).

Illustration 19 : Vue générale des gonades mâles, testicules, de *N. furzeri* en coupe longitudinale chez un mâle de 1 mois, de 3 mois et de 6 mois (HE).

Illustration 20 : Vue rapprochée de la structure des testicules de *N. furzeri* montrant les lobules et tubules séminifères, mâle de 1 mois (HE).

Illustration 21 : Vue générale des gonades femelles, ovaires de *N. furzeri* en coupe longitudinale chez une femelle de 1 mois, 4 mois et 7 mois (HE).

Illustration 22 : Vue rapprochée de l'ovaire de *N. furzeri* de 7 mois (HE).

Illustration 23 : Stades de développement de l'ovocyte chez une femelle de 7 mois (HE).

Illustration 24 : Vue générale du parenchyme rénale en coupe longitudinale chez *N. furzeri* mâle de 3 mois (HE).

Illustration 25 : Vue rapprochée du glomérule rénal chez *N. furzeri* mâle de 3 mois en coupe longitudinale (HE).

Illustration 26 : Histologie topographique indiquant les principaux axes cartilagineux du crâne de *Nothobranchius furzeri* en coupe longitudinale, femelle de 3 mois (HE).

Illustration 27 : Vue rapprochée des trois tissus de soutien principaux chez *N. furzeri*, femelle de 7 mois, en coupe longitudinale (HE).

Illustration 28 : Histologie topographique de la notocorde en coupe longitudinale chez *N. furzeri*, mâle de 1 mois (HE).

Illustration 29 : Vue rapprochée de la notocorde en coupe longitudinale chez *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE).

Illustration 30 : Coupe longitudinale de la queue de *N. furzeri* (HE).

Illustration 31 : Vessie natatoire de *N. furzeri*, femelle de 1 mois en vue générale et vue rapprochée de l'aspect crâniale (HE).

Illustration 32 : Vue générale de la topographie oculaire chez *N. furzeri*, mâle de 1 mois (HE).

Illustration 33 : Œil de *N. furzeri*, femelle de 1 mois (HE).

Illustration 34 : Encéphale de *N. furzeri*, coupes longitudinales chez un mâle de 1 mois et de 5 mois (HE).

Illustration 35 : Vue rapprochée de la moelle spinale de *N. furzeri* femelle de 3 mois en coupe longitudinale (HE).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ATP** : Adénosine tri-phosphate
- CHU** : Centre hospitalier universitaire
- CMM** : Centre mélanomacrophage
- CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique
- CREFRE** : Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales
- CRP** : Protéine C-réactive
- EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
- ENVT** : École Nationale Vétérinaire de Toulouse
- GH** : Growth hormone
- HE** : Hémalun-Éosine
- IGF-1** : Insuline-Like growth factor-1
- IL-6** : Interleukine 6
- Inserm** : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
- MEC** : Matrice Extra-cellulaire
- NIA** : National Institute of Aging
- N. furzeri** : Nothobranchius furzeri
- OMS** : Organisation mondiale de la santé
- PBS 1X** : Solution saline tamponnée au phosphate
- ROS** : Reactive oxygen species
- TNF- α** : Tumor necrosis factor α

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de fixation, décalcification et mise en blocs de paraffine des *N. furzeri*

Annexe 2 : Cytomine ENVT – plateforme en ligne

INTRODUCTION

Le vieillissement, la compréhension de ses mécanismes et de ses conséquences, ainsi que la volonté de l'influencer, sont au cœur de nombreuses études depuis plusieurs dizaines d'années (Sierra 2016). Ce sujet prend de plus en plus d'importance car il possède notamment des enjeux démographiques et socioéconomiques (Bonnet et al. 2021).

Un article publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à plus de 1,6 milliards le nombre de personnes âgées de plus de 65 ans d'ici 2050 sur terre, dont 618 millions pourraient connaître une situation de dépendance (OMS 2015). En effet, l'allongement de l'espérance de vie, associé à une diminution de mortalité chez les individus âgés, n'est pas synonyme de vieillissement en bonne santé. Le vieillissement demeure le principal facteur de risque d'apparition des maladies chroniques telles que les maladies neurodégénératives ou le diabète. Il est également responsable plus généralement du déclin fonctionnel (Kennedy et al. 2014). Ainsi, l'étude du vieillissement représente un enjeu majeur de santé publique. Ensuite, il est important de noter l'aspect progressif et irréversible du vieillissement qui peut affecter un ou plusieurs organes et dont l'expression varie selon les individus (Muller 2004). C'est alors qu'apparaît l'intérêt des gérosociences, qui s'intéressent à la compréhension des processus biologiques du vieillissement de manière à prévenir le vieillissement, par rapport à la gériatrie qui vise à traiter les pathologies quand elles se manifestent. Les gérosociences ont pour objectif d'apporter des progrès dans la prise en charge précoce du vieillissement en retardant l'apparition de maladies chroniques et d'en diminuer la sévérité (Sierra 2019). Cette discipline émergente, devient un enjeu à l'échelle mondiale pour la médecine de demain, ciblant la biologie des processus de vieillissement, afin de préserver les fonctions vitales et gérer la prévention avant le début de l'invalidité et de la maladie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de recherche INSPIRE, mené à l'initiative du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse et de ses partenaires (*Projet INSPIRE – soyez acteurs du bien vieillir*) et dans sa continuité l'IHU HealthAge (Pouch 2023). Ces projets sont dédiés aux gérosociences et ont l'ambition de promouvoir le vieillissement en bonne santé. L'objectif est de constituer une base de données et de ressources cliniques et biologiques à partir d'une cohorte humaine de grande envergure et de cohortes animales, afin d'avoir une approche intégrée centrée la prévention et la compréhension, sur la quête de marqueurs

biologiques prédictifs de l'évolution des capacités intrinsèques décrites par l'OMS (De Souto Barreto et al. 2021). Parmi les cohortes animales, miroir de la cohorte humaine, des cohortes murines (*Mus musculus*) et une cohorte de poisson avec notamment l'importation de l'African killifish, aussi connu sous son nom scientifique : *Nothobranchius furzeri*. Ce poisson possède la particularité d'être un vertébré à durée de vie courte (« short-lived ») unique présentant un vieillissement accéléré de tous ses organes, et représentant donc un modèle pour le vieillissement chez l'Homme.

L'intérêt de *Nothobranchius furzeri* dans le domaine des gérosiences est illustré par la littérature scientifique : 198 résultats pour la recherche des publications sur le site PubMed avec le mot clé « *Nothobranchius furzeri* » entre 2003 et 2023 (www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ 19 octobre 2023) avec une augmentation exponentielle des publications sur les dernières années. Pour autant, les caractéristiques histologiques de ce poisson et leur évolution au cours de sa courte vie restent encore mal connues et peu rapportées dans la littérature. C'est pourquoi dans une première partie, bibliographique, cette thèse s'applique à présenter ce nouveau modèle et à justifier son utilisation dans les études portant sur le vieillissement. La seconde partie, expérimentale, s'applique à construire un atlas histologique de référence de *Nothobranchius* pouvant servir de support aux différentes études utilisant ce modèle. Cet atlas est implémenté dans ce travail de thèse avec des images de *Nothobranchius* des 2 sexes, à différents âge étagés de 1 à 7 mois de vie, en coupe transversale. Après une mise au point de la technique histologique, des lames réalisées sélectionnées pour leur qualité sont numérisées et annotées. L'ensemble de ces travaux de thèse ont été menés en étroite collaboration avec l'équipe 2 de l'institut RESTORE qui abrite une zootechnie poisson dédiée à *Nothobranchius furzeri* et qui a fourni tous les individus de l'étude. Ce manuscrit de thèse, qui s'attache à rapporter l'histologie des différents organes et tissus de *Nothobranchius furzeri*, ne représente qu'un support écrit. Il est complété par une collection de 150 lames d'histologie numérisées annotées déposées sur une plateforme de microscopie virtuelle collaborative Cytomine-Patim. Ces lames constituent la première contribution à un atlas d'histologie numérique qui se veut à terme être disponible à la consultation pour la communauté scientifique et à l'implémentation collaborative par des centres de référence pour *Notobranchius furzeri*.

PARTIE I - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

NOTHOBRANCHIUS FURZERI : UN NOUVEAU MODÈLE D'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT

I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI

A. Taxonomie

1. Classe : Actinoptérygiens

Les actinoptérygiens regroupent les poissons à nageoires qualifiées de rayonnées. Ils forment le plus grand et le plus varié des groupes au sein des vertébrés (Hughes et al. 2018). Cette classe comprend plus de 30 000 espèces différentes dont toutes, sauf une cinquantaine, sont des téléostéens, c'est-à-dire des poissons osseux (Betancur-R et al. 2013). À l'inverse des autres branches de l'arbre phylogénétique des vertébrés, comme les mammifères ou les oiseaux pour lesquelles la phylogénie et la cinétique d'évolution sont assez bien connues et décrites, ces informations sont difficiles à déterminer pour la classe des Actinoptérygiens. La phylogénie de cette classe est essentiellement basée sur des caractères morphologiques (Near et al. 2012).

2. Ordre : Cyprinodontiformes

Les Cyprinodontiformes sont plus couramment connus sous le nom de *killifish*, *topminnows* ou encore *toothcarps* dans la littérature. Cet ordre inclue près de 700 espèces réparties dans les régions tempérées du monde et particulièrement dans les eaux douces tropicales (Figure 1). Certaines espèces appartenant à cet ordre évoluent et survivent dans des environnements extrêmes comme des sources chaudes, des lacs gelés de montagne et des estuaires hypersalins (Hertwig 2008).

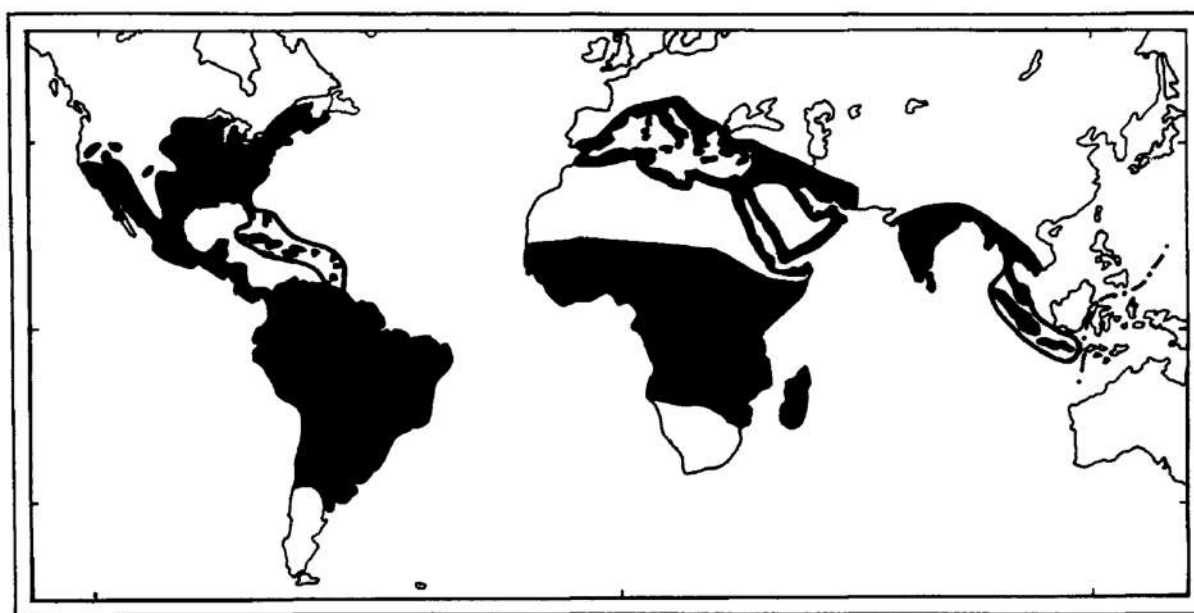


Figure 1 : Répartition des populations de Cyprinodontiformes dans le monde en 1981 (Parenti 1981).

La classification se base uniquement sur des caractères morphologiques avec parmi eux (Parenti 1981) :

- Nageoire caudale symétrique
- Pré-maxillaire en deux parties cartilagineuses alvéolaires
- Première arête arrivant sur la parapophyse de la seconde vertèbre et non de la troisième

3. Famille : Notobranchiidae

Cette famille est la plus diversifiée des trois familles appartenant à la super-famille des Aplocheiloidei. Les familles également comprises dans la super-famille des Aplocheiloidei sont les Aplocheilidae et les Rivulidae (Figure 2).

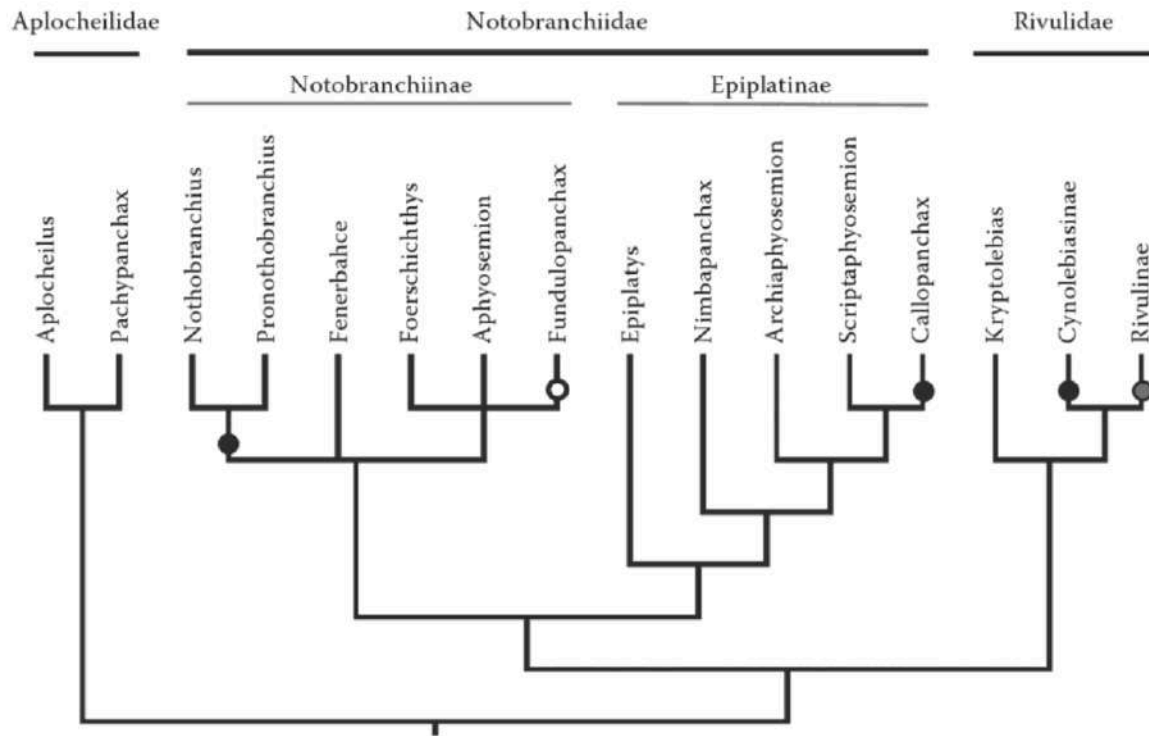


Figure 2 : Proposition d'arbre phylogénétique de la super-famille des Aplocheiloidei (Reichard 2015)

4. Genre : Nothobranchius

Le terme Nothobranchius vient du grec « *nothos* » signifiant « faux » et de « *branchius* » pour les branchies. Cette appellation fait donc référence à la faible amplitude d'ouverture de l'opercule chez les poissons de ce genre (Parenti 1981). Le genre représente environ une soixantaine d'espèces caractérisées par leur petite taille. Les *nothobranchius* vivent dans des bassins éphémères de l'Est et du Sud-ouest du continent africain se formant durant la saison des moussons.

Des synapomorphies sont proposées pour ce genre par Parenti (1981) :

- Ouverture du canal périoculaire, non représentée par un pore
- Attachement du cartilage interarc directement sur le second arc pharyngobranchial
- Œufs de forme ovale

Leur cycle de vie a la particularité de présenter une maturation précoce des individus avec une longévité estimée à seulement quelques mois après éclosion. Les embryons sont capables d'entrer en diapause pour survivre à la saison sèche (Terzibasi Tozzini, Cellerino 2020).

B. Habitat, répartition et organisation des populations

1. Habitat de *Nothobranchius furzeri*, répartition et contexte historique.

La répartition et l'habitat de *Nothobranchius furzeri* sont particulièrement bien étudiés. Une aire de répartition connue des Nothobranchius se situe dans le parc national de Gona Re Zhou (GRZ) au Zimbabwe, dans lequel les premières populations de Nothobranchius ont été prélevées en 1968. D'autres populations se trouvent au Mozambique, dans une région proche de la frontière avec le Zimbabwe (Figure 3.1.). Les populations de killifish s'établissent entre 16 et 422 mètres d'altitude (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016)

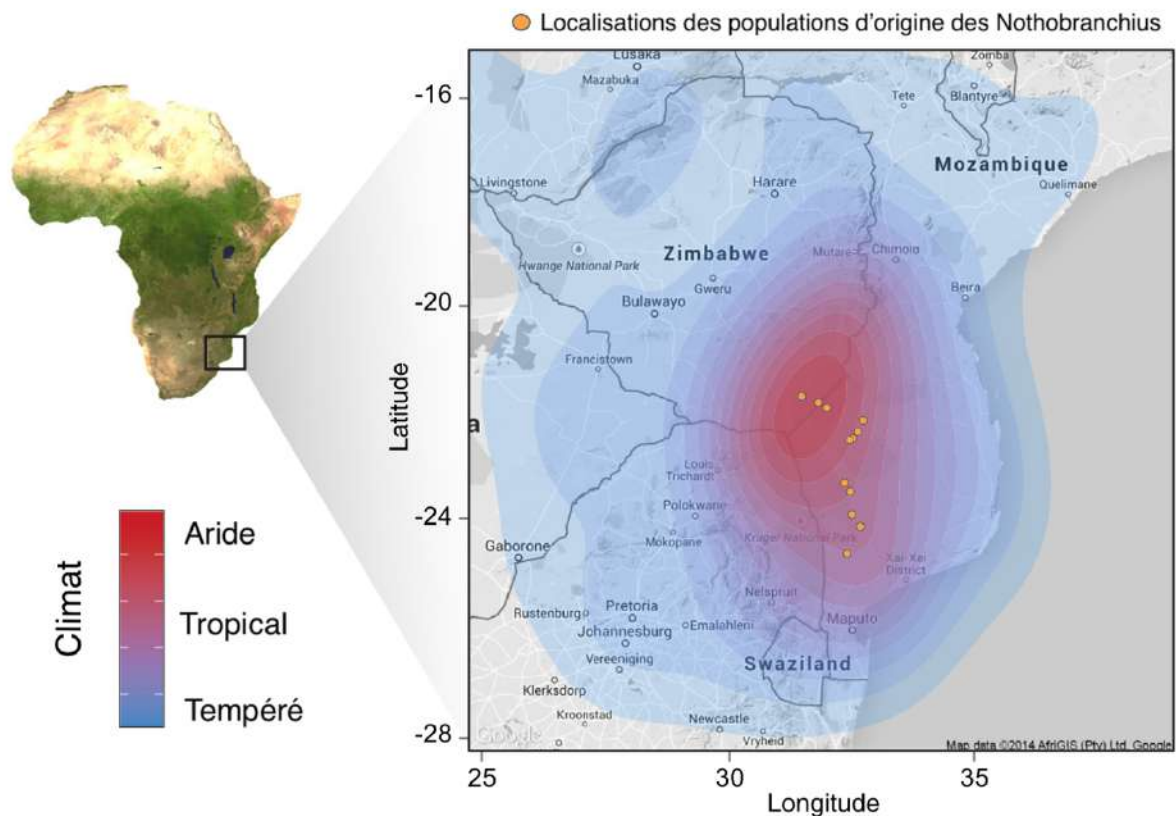


Figure 3.1. : Situation géographique et climat de l'habitat naturel des Nothobranchius (modifié d'après Cellerino, Valenzano, Reichard 2016)

Historiquement, deux souches de *N. furzeri* sont décrites.

La souche GRZ, ayant une médiane de survie de 2 à 3 mois est qualifiée de souche ayant la plus courte espérance de vie. Son nom lui vient de la région dans laquelle il a été prélevé en 1968, le parc national de GRZ au Zimbabwe. Son lieu de vie était semi-aride, ne connaissant que de rares précipitations de manière erratique, pouvant expliquer l'évolution de cette souche n'ayant une espérance de vie brève (Terzibasi et al. 2008).

La souche MZM, dont la médiane de survie avoisine les 6 mois en milieu naturel, se qualifie elle comme l'espèce ayant la plus longue espérance de vie. Les populations de souches MZM sont également issues du parc National GRZ au Zimbabwe mais sont retrouvées dans des régions de plus faible altitude, moins arides (Figure 3.2.).

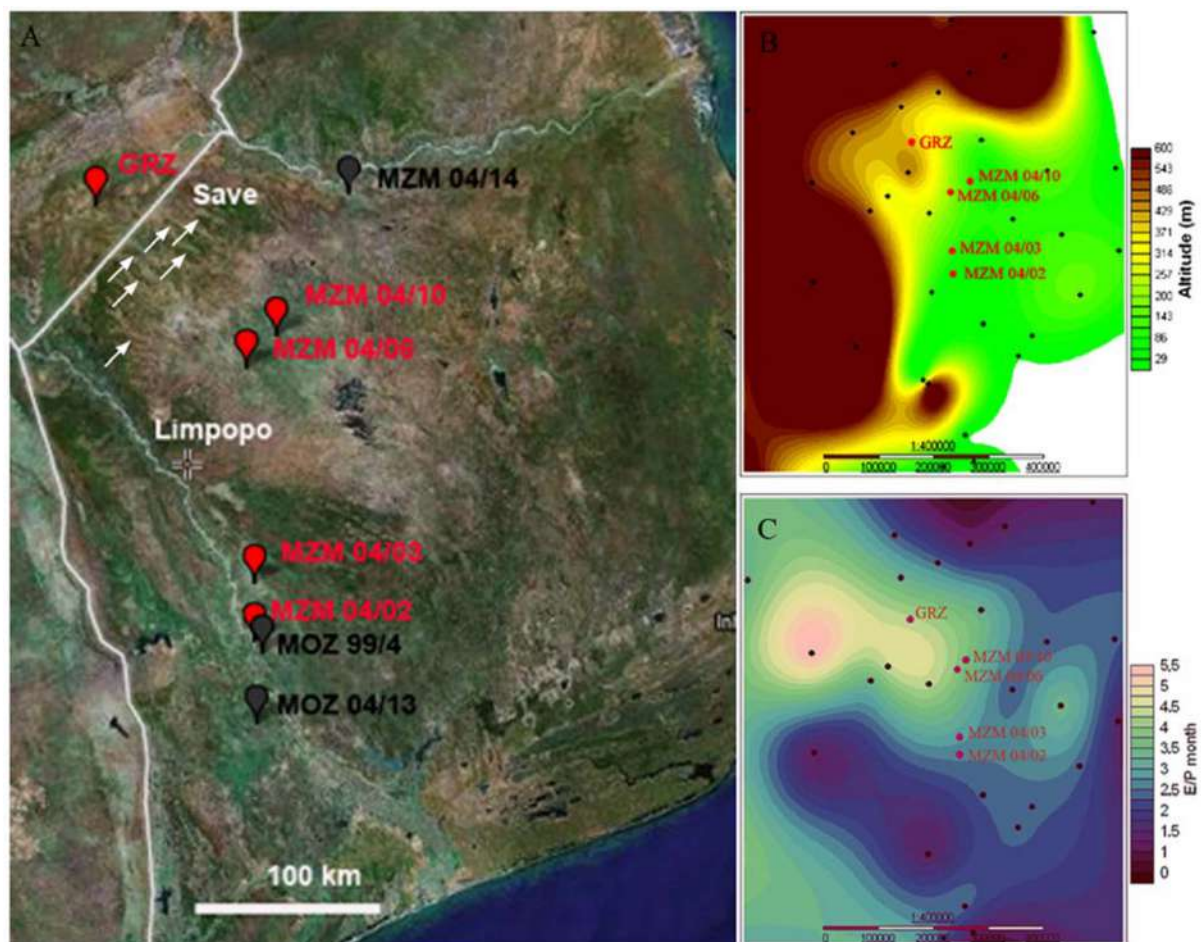
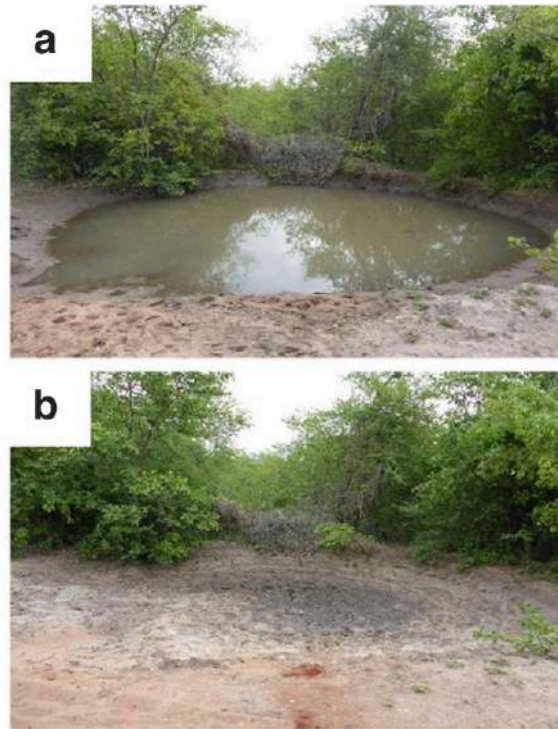


Figure 3.2. : Localisation des habitats de N. furzeri (Terzibasi et al. 2008)

(A) Vision satellite des habitats de *N. furzeri*. En rouge, les souches pour lesquelles des données sur l'espérance de vie ont été relevées. En noir, ceux pour lesquels il n'y a pas de données liées à l'espérance de vie. Save et Limpopo sont les deux grandes rivières bordant l'aire de distribution des habitats. Les flèches indiquent le sens du vent provenant du plateau du Gona Re Zhou. (B) Altitudes sur l'aire géographique. (C) Ration entre évaporation et précipitations sur l'aire géographique relevé sur 30 ans.

Les populations de *Nothobranchius* subissent l'imprévisibilité de l'alternance des périodes arides et de pluie. Les populations ont, selon les années, des environnements favorables à leur développement durant seulement 2 à 7 mois (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016). *N. furzeri* peut évoluer dans des environnements particulièrement arides. Son habitat correspond aux savanes herbeuses et boisées qui abritent des mares, aux ruisseaux et rivières semi-permanentes (Figure 4). Ces mares se forment dans des dépressions au niveau d'un sol peu poreux, calcimorphes ou argileux, qui recueillent et stockent les eaux de pluie au moment de la mousson (Terzibasi Tozzini, Cellerino 2020).

Les éléments nutritifs sont alors apportés par les herbivores qui sont majoritairement du bétail actuellement mais qui pouvait être de la faune sauvage de passage pour s'abreuver par le passé (Reichard, Polačik, Sedláček 2009).



*Figure 4 : Exemple d'habitat propice au développement de *N.furzeri* en (a) saison des moussons et en (b) saison aride, adapté de Terzibasi Tozzini, Cellerino 2020.*

1. Dimorphisme sexuel et polymorphisme

Tous les poissons du genre *Nothobranchius*, y compris *N.furzeri* possèdent un dimorphisme sexuel évident. Les mâles sont davantage colorés que les femelles qui restent ternes.

Chez le mâle, il existe deux types de coloration dont la différence majeure se situe au niveau de la nageoire caudale qui est soit rouge, soit jaune (Figure 5) (Reichard, Polačik, Sedláček 2009). Le phénotype possédant la nageoire caudale jaune a également une bande noire à l'extrémité de la nageoire caudale et dérive de la souche GMZ. Le phénotype de la souche

MZM correspond à la coloration exclusivement rouge de la nageoire caudale (Anagnostopoulos et al. 2021). Actuellement, la plupart des populations sont composés des deux phénotypes mais certaines sont représentées seulement par le phénotype rouge et donc issus de la souche MZM. Ce trait de phénotype pourrait présenter un avantage évolutif, le rouge étant mieux perçu dans les eaux claires mais très peu en eaux troubles à l'inverse du jaune. Cette caractéristique doit donc vraisemblablement impacter la sélection sexuelle du partenaire. Cependant, la couleur tend à évoluer avec l'âge. Ce phénomène pourrait probablement être lié à une variation de l'expression des gènes responsables du phénotype (Ng'oma et al. 2014).

La femelle, quant à elle, est toujours plus petite que le mâle et possède des nageoires translucides et un corps pâle. En particulier chez *N.furzeri*, elle possède souvent des écailles irisées (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016).

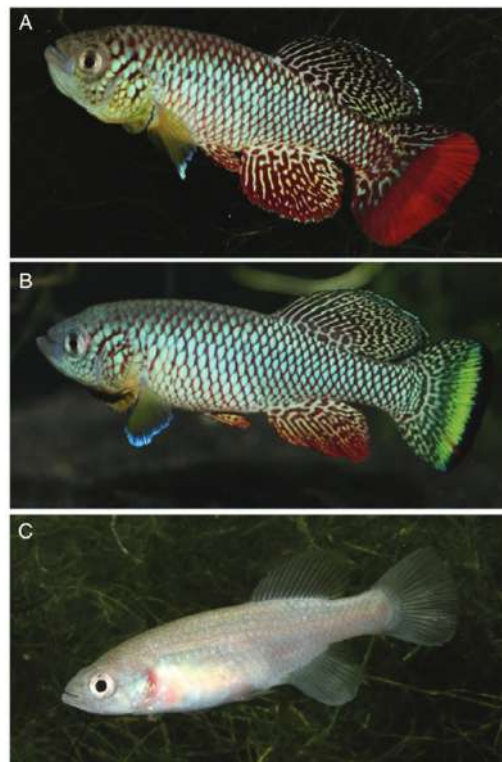


Figure 5: Photographies de N. furzeri mâle adulte avec phénotype queue rouge (A), mâle adulte avec phénotype queue jaune (B) et femelle adulte (C) (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016).

2. Détermination du sexe et variation des sex-ratio dans la nature

Le sexe de *N. furzeri* est strictement déterminé génétiquement et ne dépend en aucun cas ni de l'environnement, ni de ces conditions, comme ce peut être le cas pour d'autres espèces de poissons, incluant le poisson-zèbre, un autre modèle animal très utilisé dans la recherche fondamentale. *A priori*, le génotype de *N. furzeri* impliquerait qu'il y ait 50% de mâles et 50% de femelles. Néanmoins, dans leur environnement naturel, les femelles semblent souvent être majoritaires. Cette observation pourrait être liée au comportement de prédatons entre les mâles (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016).

3. Alimentation

La source principale de l'alimentation des *Nothobranchius* dans leur environnement naturel, incluant *N. furzeri*, sont de petits invertébrés, mais cette source peut varier en fonction de leur disponibilité faisant du *N. furzeri* un prédateur opportuniste. Des études menées sur 4 populations de *N. furzeri* se sont intéressées à leur alimentation ont montré qu'ils préfèrent les petits crustacés (Polačik, Reichard 2010).

C. **Cycle de vie**

1. Système de reproduction

La stratégie de reproduction de *N. furzeri* est la polygynandrie. La femelle pond en moyenne entre 20 et 50 œufs par jour et ce nombre varie grandement en fonction des ressources disponibles et de l'âge ainsi que la taille de la femelle (Blažek, Polačik, Reichard 2013). Les mâles sont constamment prêts à frayer les pontes et établissent entre eux une hiérarchie basée sur leur taille (Polačik, Reichard 2009). Ils sont actifs et explorent le territoire à la recherche de femelles. Les *Nothobranchius* ne sont pas considérés comme des animaux strictement territoriaux mais il y a généralement l'établissement de zones de ponte qui sont, le plus souvent, contrôlées par les mâles dominants. Les œufs sont pondus dans le sédiment et les nombreuses secousses réalisées durant la parade et la ponte permettent de les couvrir et les protéger (Cellerino, Valenzano, Reichard 2016).

2. Cycle de vie

N. furzeri possède un environnement adéquat à son développement pendant seulement une brève période de l'année. Il passe donc une majorité de son cycle en diapause (Terzibas Tozzini, Cellerino 2020). Les formes adultes se développent et se reproduisent dans un substrat boueux et quand il redevient sec, cela assure le maintien des embryons en diapause jusqu'au retour des pluies.

La diapause se définit comme une interruption temporaire du développement embryonnaire caractérisé par un ralentissement du métabolisme. On retrouve généralement 3 phases facultatives nommées diapauses I, II et III. Ces phases prolongent la durée d'incubation des œufs mais également leur durée de vie (Furness 2016).

L'embryogénèse de *N. furzeri* connaît une phase de dispersion cellulaire, quand la cellule en est à environ 50% d'épibolie. À cette étape, l'embryon est susceptible d'entrer en diapause I. Il en sort lorsque les conditions sont favorables et une réagrégation cellulaire a lieu. En effet, le développement embryonnaire dépend du processus de dispersion et de réagrégation pouvant être perturbés par des situations de stress (température, disponibilité en oxygène, photopériode) retardant l'embryogénèse. C'est dans ces conditions que l'œuf entre en diapause I. Les cellules survivent grâce à un métabolisme anaérobie (Wourms 1972).

Suivant cette phase de dispersion, l'axe embryonnaire apparaît et s'en suivent la réagrégation des cellules et la formation du tube neural. Les phases de somitogénèse et de morphogénèse du système nerveux succèdent ces événements et à cette période peut avoir lieu la diapause II. Le système cardiovasculaire se développe avant la diapause II mais n'est pas encore fonctionnel. Son fonctionnement est un critère de fin à la diapause II (Wourms 1972).

Puis le développement embryonnaire s'achève, et sous l'influence de facteurs de l'environnement, notamment une augmentation de l'humidité, une diminution en oxygène, l'embryon passe en diapause III en attendant l'éclosion (Reichard, Poláčik 2019) (Figure 6).

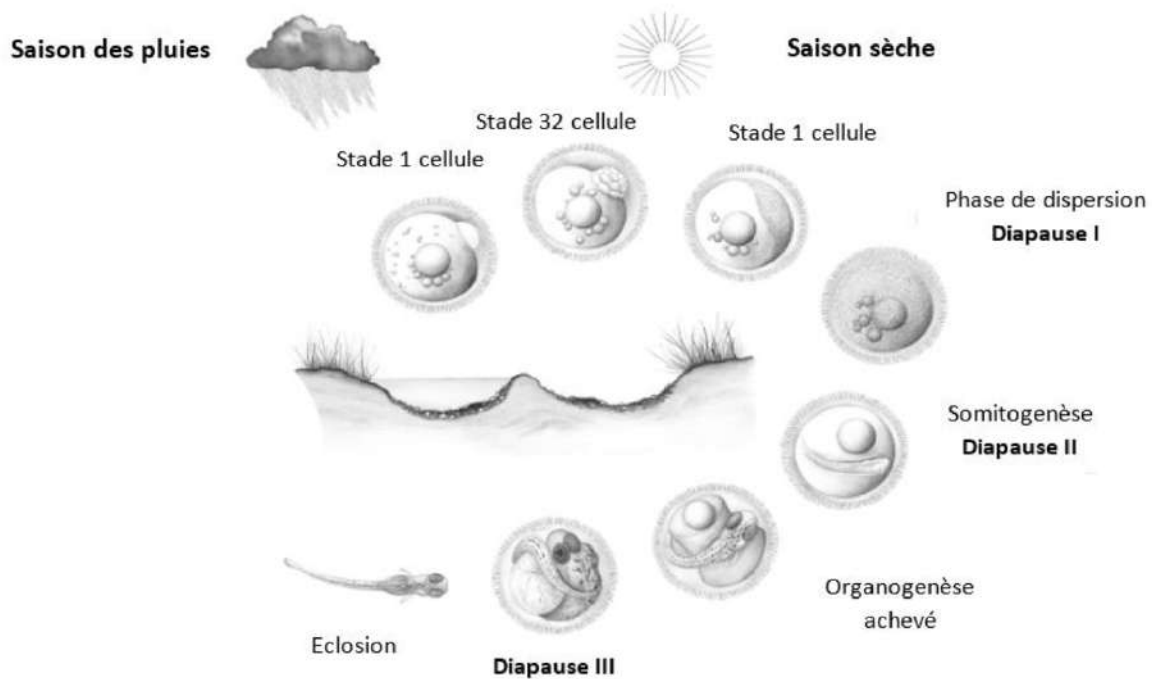


Figure 6 : Développement embryonnaire et phases de diapause chez N. furzeri (Platzer, Englert 2016)

Ce n'est que lorsque les conditions de l'environnement deviennent favorables que l'éclosion des œufs peut avoir lieu et cela se produit à l'arrivée de la saison des moussons, quand les œufs enfouis se retrouvent un substrat humide. L'éclosion se fait de manière asynchrone car elle résulte des pluies mais également des prédispositions individuelles et celle-ci peut s'étendre sur une vingtaine de jours. Les œufs sont alors préservés des éclosions précoces lors de pluies inattendues et sporadiques en pleine saison sèche. La maturité sexuelle est atteinte très rapidement chez *N. furzeri*, aux alentours de 3 à 4 semaines de vie et s'en suit une période de reproduction en fin de période inondée. La fécondité de *N. furzeri* est élevée et peuvent se reproduire dès le début de leur maturité sexuelle jusqu'à la fin de leur vie (Polačik, Donner, Reichard 2011).

L'environnement étant éphémère et de durée aléatoire, deux situations ont été constatées quant au devenir de la génération suivante. Dans un premier scénario, la période de reproduction a lieu vers la fin de la période humide et les œufs fécondés entrent en diapause pour une durée de plusieurs mois (6 à 8 mois) jusqu'à un nouveau remplissage du bassin au cours de l'année

suivante. Cette première situation est la plus décrite et a donné aux poissons du genre *Nothobranchius* leur appellation d'« *annual killifish* » dans la littérature. Mais quelques fois, même si cela est plus anecdotique, la période de reproduction est suivie d'une persistance de l'environnement inondé favorable au développement des nouveaux embryons. Ceux-ci n'entrent donc pas en diapause mais éclosent, les bonnes conditions étant rassemblées : deux générations de *N. furzeri* voient donc le jour au cours d'une même année (Figure 7).

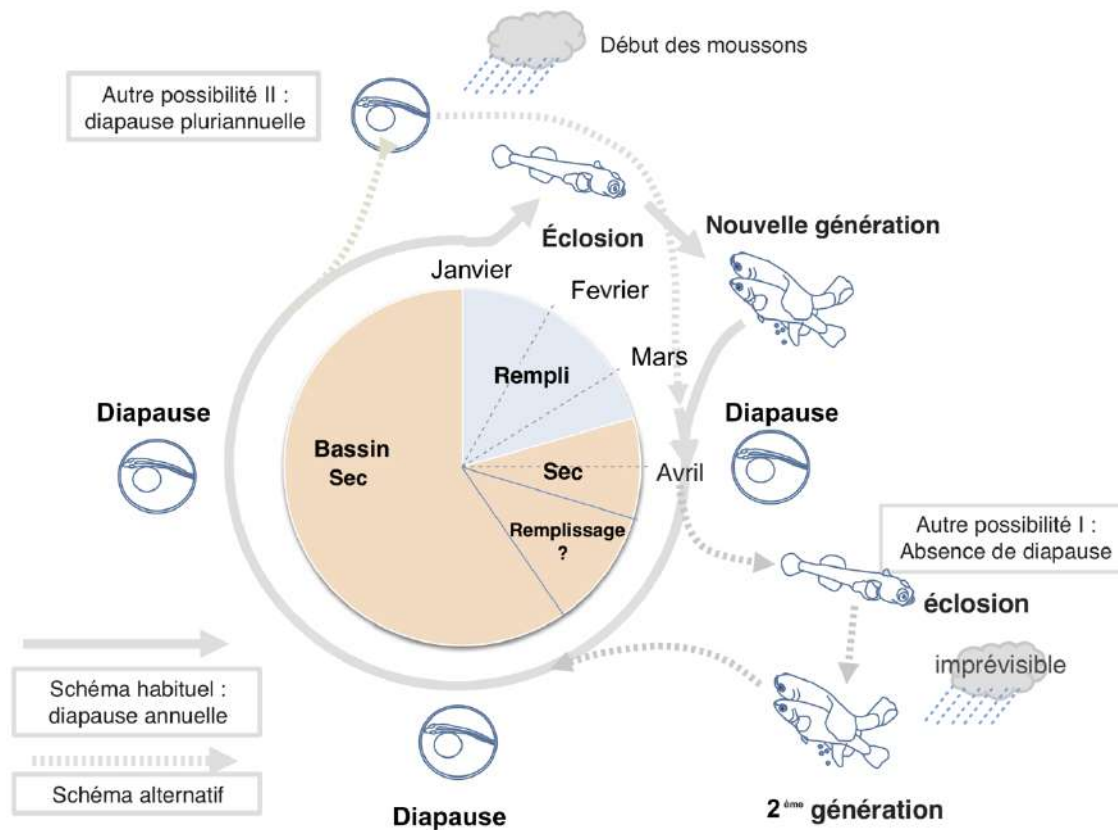


Figure 7 : Schéma du cycle de vie de *N. furzeri* adapté de Cellerino, Valenzano, Reichard 2016.

II. PLACE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI DANS L'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT

A. Le vieillissement et son étude

1. Définition du vieillissement

Le vieillissement correspond à une évolution dans le temps, considérée comme physiologique, qui conduit invariablement au dysfonctionnement des organes et finalement, à la mort. Il est le fruit de la réduction progressive des réserves fonctionnelles des individus (OMS 2015).

Bien qu'il affecte tous les êtres vivants, le vieillissement se manifeste différemment selon les individus et ne suit pas nécessairement la même cinétique d'évolution. En effet, celui-ci peut être accéléré par certaines habitudes de vie comme la sédentarité et une mauvaise nutrition, et les conséquences peuvent être l'apparition de maladies chroniques évitables telles que : broncho-pneumonie chronique obstructive, cancers, cirrhose, obésité, diabète de type 2, hypertension artérielle, accident vasculaire cérébral, etc. (Guilbaud, et al. 2020).

Même si la définition semble simple, les mécanismes à l'origine du vieillissement sont eux encore mal définis et font l'objet d'études et de controverses (Cohen et al. 2020). Dans les années 90, une revue publiée par Zhores A. Medvedev listait 300 théories concernant le vieillissement (Medvedev 1990). Cependant, il est généralement reconnu comme étant la résultante de multiples facteurs (Dufour 2021).

2. Les mécanismes cellulaires du vieillissement

Si le vieillissement pouvait être surveillé, monitoré, les maladies chroniques citées précédemment, qui sont la conséquence du vieillissement, pourraient être prises en charge bien avant leurs manifestations cliniques. En effet, la période de latence de ces affections est généralement longue tandis que la période qui suit l'apparition des symptômes et pendant laquelle un traitement pourrait encore être efficace est très brève. En identifiant clairement les indicateurs spécifiques au vieillissement, une intervention précoce pourrait alors être envisagée permettant de retarder voire d'enrayer l'apparition d'une maladie chronique. D'où l'intérêt grandissant au sujet de la surveillance des biomarqueurs du vieillissements (Kudryashova et al. 2020).

L'accumulation d'anomalies touchant à l'intégrité biologique est largement considérée comme étant la première cause du vieillissement. Les évènements à l'origine de ces anomalies concernent en premier lieu la structure et les interactions moléculaires à l'échelle de la cellule. Le fait est que le nombre de molécules possédant une structure ou une fonction altérée augmente avec l'âge et cela contribue progressivement au dysfonctionnement d'une cellule, d'un organe (Kudryashova et al. 2020). Plusieurs paramètres, à l'échelle cellulaire et moléculaire, sont considérés comme ayant un lien avec le vieillissement et sont représentés sur la figure 8.

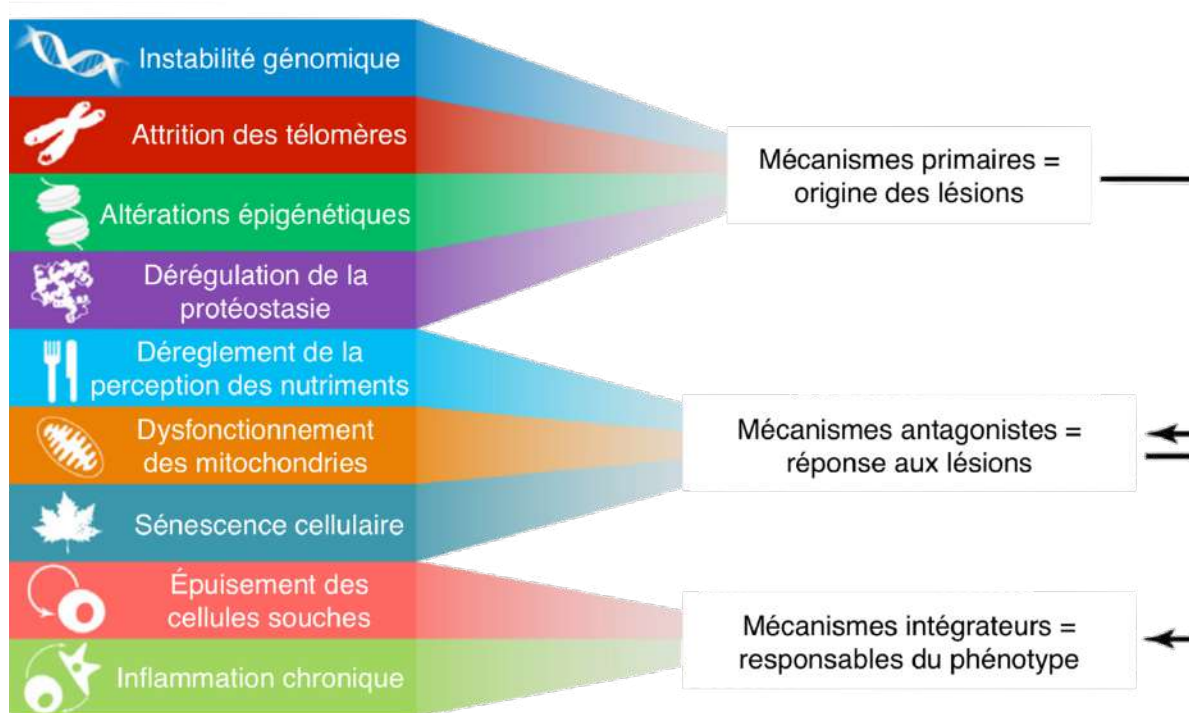


Figure 8 : Interconnexion des mécanismes biologiques du vieillissement (adapté d'après López-Otín et al. 2013).

Ces neuf paramètres peuvent être organisés en trois groupes (López-Otín et al. 2013) :

- Les mécanismes primaires correspondent aux causes des dommages qui s'accumulent au cours du vieillissement
- Les mécanismes antagonistes correspondent aux réponses des dommages
- Les mécanismes intégrateurs sont eux les conséquences de ces réponses et imposent un phénotype

a) *Instabilité génomique*

Les dommages au niveau de l'ADN peuvent être provoqués par des facteurs endogènes (stress métabolique), ou exogènes (radiations, agents chimique génotoxiques) (Aunan et al. 2016). L'organisme est pourtant doté de puissants systèmes de réparation de l'ADN permettant la stabilité du génome mais ils ne sont pas infaillibles. Le nombre d'erreurs faites par les mécanismes de réparation semblent augmenter avec l'âge faisant alors s'accumuler le nombre de mutations génétiques (Gorbunova et al. 2007) ou de cellules aneuploïdes (Dufour 2021).

b) Attrition des télomères

Il a été montré en 1961 que les cellules somatiques ne se divisent que pour un nombre limité de cycles cellulaires. Plus tard, d'autres études ont permis d'expliquer l'arrêt de la réplication qui a pour cause le raccourcissement des télomères. Les télomères sont des séquences hautement répétitives de l'ADN situées aux extrémités des chromosomes et sont responsables du maintien de l'intégrité des chromosomes (Aunan et al. 2016). Avec le vieillissement, les réplifications de l'ADN des cellules somatiques deviennent incomplètes et lorsque les télomères atteignent une longueur minimale critique, il y a une réponse aux dommages subis par l'ADN qui entraîne une augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire. Cela aboutit à la sénescence cellulaire qui signifie que la cellule entre dans un nouvel état permanent dans lequel il n'existe plus de division cellulaire (Childs et al. 2017).

c) Altérations épigénétiques

Il existe différents mécanismes qui modulent l'expression des gènes en fonction des signaux de l'environnement (Ferrucci et al. 2016). Dans le contexte d'études sur le vieillissement, il a été montré qu'il pouvait y avoir une altération de l'état fonctionnel des cellules sans pour autant qu'il y ait de modifications au niveau de l'ADN. Les altérations épigénétiques regroupent la méthylation de l'ADN, la modification des histones ainsi que le remaniement de la chromatine et ces phénomènes sont susceptibles de modifier le fonctionnement cellulaire (Gorbunova et al. 2007).

d) Dérégulation de la protéostasie

La protéostasie réunit tous les mécanismes qui gèrent la synthèse, le repliement et la dégradation des protéines. L'efficacité de ces mécanismes décroît avec le temps surtout dans les cellules qui ne se divisent pas ou peu comme les neurones ou les cellules des muscles striés squelettiques. Ces cellules se retrouvent alors à devoir gérer une certaine quantité de déchets ce qui contribue à l'apparition de maladies. À l'échelle de la cellule, la perte de protéostasie se traduit par l'accumulation de protéines, repliées ou non, dans le cytoplasme et les organites. Des agrégats se forment alors et sont organisés, comme la substance amyloïde mise en cause dans la maladie d'Alzheimer, ou amorphe, comme les α -crystallin responsables de la cataracte. Chez l'Homme, la mise en évidence d'agrégats protéiques est un caractère commun des maladies neurodégénératives d'Alzheimer et de Parkinson (Gonçalves et al. 2022).

e) Dérèglement de la perception des nutriments

L'axe somatotrope chez les mammifères inclue dans son fonctionnement l'hormone de croissance, *growth hormon* (GH), sécrétée par la partie antérieure de l'hypophyse et son second médiateur, l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), produite en réponse à une stimulation par la GH par plusieurs types cellulaires. Cette voie de signalisation régule non seulement la perception des nutriments mais également plusieurs mécanismes cellulaires en réponse au stress.

D'autres voies de signalisation ont également été décrites dans le contexte des études dans le domaine des gérosiences. Des modifications dans ces voies de signalisation au cours du vieillissement influencent le bilan énergétique et la perception des nutriments et certaines études rapportent que cela module la longévité chez plusieurs organismes (López-Otín et al. 2013).

f) Sénescence cellulaire

L'accumulation de dommages au niveau de l'ADN peut entraîner un état permanent de sénescence cellulaire. En effet, la sénescence correspond à un arrêt des cycles cellulaires en réponse au stress subi par les cellules associé à des modifications phénotypiques stéréotypées (López-Otín et al. 2013). Suivant l'intensité du stress, les cellules peuvent suivre la voie de l'apoptose et habituellement, les cellules sénescents comme les débris apoptotiques sont éliminés par le système immunitaire (van Deursen 2014). Or, avec le vieillissement, le nombre de cellules sénescents augmente, potentiellement en partie à cause d'un système immunitaire moins efficace, d'une incapacité à stabiliser les effecteurs de l'apoptose ou encore une accumulation d'erreurs sans que la gravité ne déclenche l'apoptose (Hudson et al. 2013).

g) Dysfonctionnement des mitochondries et stress oxydatif

Des études concernant le vieillissement et les pathologies associées ont montré que les mitochondries subissaient des changements de fonction, de distribution et de structure (Chistiakov et al. 2014).

Les mitochondries sont des organites autonomes remplissant la fonction de respiration cellulaire permettant la production d'énergie et de synthèse de l'ATP. Elles sont de grandes consommatrices d'oxygène et l'un des produits de leur métabolisme sont les ROS qui causent des dommages oxydatifs à l'ADN, aux protéines et lipides de la mitochondrie ainsi que de la cellule. Avec l'âge, il y a une accumulation des dommages oxydatifs au niveau des mitochondries ce qui provoque une baisse de l'efficacité de la chaîne respiratoire et donc une baisse de la production d'ATP (Dufour 2021).

De plus, le renouvellement des mitochondries est essentiel pour maintenir leur bon fonctionnement au cours de la vie mais avec le vieillissement, il y aurait une diminution de biogénèse des mitochondries et une efficacité moindre des systèmes d'élimination des mitochondries endommagées ou dysfonctionnelles (Guerville et al. 2020).

h) Épuisement des cellules souches

Les cellules souches jouent un rôle essentiel en permettant le maintien des tissus aussi bien que leur renouvellement à la suite d'une blessure. En effet, elles possèdent la capacité de se renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires. Ces cellules sont cependant particulièrement sensibles aux modifications décrites précédemment car elles sont persistantes, à l'état de quiescence, dans l'organisme (López-Otín et al. 2013).

i) Inflammation chronique

Enfin, au cours du vieillissement, une augmentation progressive, systémique et chronique des molécules pro-inflammatoires est constatée. Cela se traduit au niveau biochimique par une augmentation des cytokines et de facteurs inflammatoires de la phase aigüe comme l'interleukine 6 (IL-6), le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et la protéine C-réactive (CRP). Ceci est lié au fait que le vieillissement entraîne une perte de la capacité à stopper la réaction inflammatoire initialement normale mais qui se retrouve maintenue même en l'absence d'élément pathogène. Cette évolution serait multifactorielle, en partie due à l'accumulation du stress antigénique auquel l'organisme est confronté. Ces taux sériques élevés de manière chronique pourraient être en partie la conséquence de certaines maladies chroniques apparaissant avec l'avancée dans l'âge (Sierra 2016).

3. Le vieillissement à l'échelle des tissus

Le vieillissement se traduit également à l'échelle des tissus. Certains portent tout particulièrement les stigmates de ce vieillissement notamment le squelette, le cerveau et la graisse viscérale.

a) Système musculo squelettique

La robustesse ainsi que la résilience de ce système diminuent avec l'âge. Autrement dit, la capacité de ces tissus à se régénérer ou se réparer décline.

Dans un premier temps, on peut noter la diminution progressive de la masse musculaire avec l'âge. La sarcopénie est d'ailleurs associée à un déclin général des fonctions vitales et un risque accru de morbidité. Elle a déjà été mise en évidence chez les chiens, chats et rongeurs comme chez l'Homme avec l'avancée en âge. Cette sarcopénie est le résultat de nombreuses interactions métaboliques mettant notamment en jeu les hormones sexuelles et les taux de GH et IGF-1. Les inflammations chroniques à bas bruit entraînant la sécrétions de cytokines pro-inflammatoires sont aussi mises en cause dans la perte de masse musculaire ainsi que l'apparition d'une résistance à l'insuline (Kealy et al. 2002).

Ensuite, la densité osseuse est régie par l'activité conjointe des ostéoblastes et des ostéoclastes. Avec le vieillissement, l'augmentation de l'activité des ostéoclastes tend à réduire la densité osseuse des individus. Chez les rongeurs ou encore chez l'Homme, ce phénomène se traduit cliniquement par une ostéopénie ou de l'ostéoporose mais ce n'est pas le cas chez le chat ou le chien bien que chez tous, une diminution de la densité osseuse soit constatée avec l'âge. Certains des mécanismes impliqués dans la perte de masse musculaire ont aussi été reconnus comme ayant un impact sur cette diminution. Un manque d'activité physique y participerait également (McKenzie 2022).

Enfin, des modifications au niveau des articulations sont observables avec le vieillissement. Globalement, le manque d'hydratation et les changements portant sur la structure du collagène dans le cartilage articulaire en sont majoritairement responsables. Cela entraîne alors une rigidité des articulations et une baisse de la résistance à la traction (Roberts et al. 2016).

b) Cerveau

De la même façon que pour les muscles, le cerveau présente une atrophie en vieillissant à cause de la mort d'un certain nombre de cellules neuronales, produites tôt au cours du développement du cerveau et qui ne seront jamais remplacées. Comme l'ensemble de la cellule disparaît, noyau comme fibre nerveuse, la matière grise et la matière blanche sont toutes deux touchées de la même manière. Ces changements sont à l'origine de maladies dites neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Vite, Head 2014).

c) Tissus adipeux

Ce tissu est initialement un lieu de stockage lorsque de l'énergie est consommée en excès par rapport aux besoins réels. Cependant, il peut aussi être métaboliquement actif et participe notamment aux changements physiologiques que subit le corps avec le vieillissement (Tropis et al. 2021).

À l'inverse des autres tissus, le tissu adipeux tend lui à augmenter en proportion avec l'âge. Sa distribution est également impactée, en effet, la proportion de masse grasse viscérale augmente bien plus que la masse grasse sous-cutanée. Ses observations ont déjà été faites et démontrées chez l'Homme et le chien. Ce phénomène prend également naissance, entre autres, à cause de l'insulino-résistance qui peut apparaître au cours du vieillissement. Une des conséquences majeures de ce changement est un plus fort taux d'obésité chez les personnes âgées que chez les jeunes (McKenzie 2022).

A. Les modèles d'étude classiques et leurs limites

Le vieillissement étant une des principales causes de l'apparition de maladies chroniques ayant un impact direct sur la diminution de l'espérance de vie, la compréhension de ce phénomène repose sur l'étude de tous les mécanismes cellulaires et moléculaires évoqués précédemment. L'utilisation de différents modèles animaux permet de répondre aux besoins de tous les champs d'étude autour du vieillissement. Parmi les modèles classiques, on retrouve des êtres unicellulaires comme les levures, des invertébrés comme les vers ou la drosophile, et enfin des vertébrés comme les rongeurs, incluant alors le rat et la souris, et le poisson-zèbre (Lees, Walters, Cox 2016).

4. Les modèles classiques invertébrés

Chacun de ces modèles utilisés en laboratoire présente un avantage précieux dans le domaine des gérosiences. Dans un premier temps, les modèles invertébrés ont présenté un intérêt pour l'identification des gènes et des voies métaboliques impliquées dans le vieillissement et la prolongation de l'espérance de vie. Ils présentent l'avantage de leur brève durée de vie permettant des expérimentations itératives et les manipulations génétiques sont relativement aisées. Les principales études sur ces espèces concernent les mécanismes génétiques impliqués dans le vieillissement incluant la perception des nutriments et la protéostasie (Guilbaud, Mailliez, Boulanger 2020).

Cependant, ces modèles ont également des limites. Bien que le génome soit facilement étudié et que les voies métaboliques soient semblables à celles décrites chez les mammifères, il manque aux organismes invertébrés un certain nombre d'organes et de systèmes qui sont cruciaux dans l'étude du vieillissement humain, notamment le sang, le système circulatoire, les cellules somatiques et l'adaptabilité du système immunitaire (Brunet 2020a).

5. Les modèles classiques vertébrés

L'intérêt majeur des modèles vertébrés, qui sont principalement le poisson zèbre et la souris, est qu'ils possèdent des organes et systèmes similaires à l'Homme. Ces modèles ont été très largement utilisés notamment pour valider les résultats génétiques déjà mis en évidence chez les invertébrés (Lees, Walters, Cox 2016).

C'est chez la souris qu'ont été mis en évidence de nouveaux gènes jouant un rôle dans l'axe somatotrope lui-même impliqué dans la régulation de l'espérance de vie. D'ailleurs, différentes molécules ont déjà été testées chez la souris dans l'objectif de ralentir, stopper voire inverser le vieillissement (Mitchell et al. 2015). Néanmoins, les besoins matériels nécessaires à l'élevage en laboratoire des souris représentent un coût important et leur espérance de vie étant d'environ 3 ans, les expérimentations ne peuvent pas être reproduites un grand nombre de fois sans nécessiter de financement conséquent (Brunet 2020a).

Les frais liés à l'élevage et l'expérimentation sur le poisson-zèbre sont plus faibles que chez la souris mais il ne s'agit tout de même pas de l'animal le plus utilisé dans les études sur le vieillissement car son espérance de vie est encore plus longue que chez les rongeurs, soit entre 5 et 6 ans (Guilbaud, Mailliez, Boulanger 2020).

Les différentes limites liées à l'utilisation de ces modèles usuels ouvrent la voie vers l'utilisation de nouveaux modèles. Parmi les nouveaux modèles, on retrouve notamment les primates ou les chiens qui sont des espèces proches de l'être humain sur les plans anatomiques et physiologiques. Mais on retrouve également des espèces moins semblables au premier abord mais qui présentent tout de même de nombreux avantages, comme le poisson téléostéen *N. furzeri* (Brunet 2020a).

B. Intérêt de *Nothobranchius furzeri* dans l'étude du vieillissement

1. Des caractéristiques biologiques d'intérêt

C'est au cours des années 60 que les *Nothobranchius* ont commencé à être étudiés. Une décennie plus tard, des études avaient montré l'apparition de changements histopathologiques au niveau des tissus hépatiques et rénaux chez *Nothobranchius*. C'est seulement en 2004 qu'une étude menée par Herrera et Jagadeeswaran a souligné l'intérêt des cyprinodontiformes dans le domaine des géosciences et particulièrement ceux du genre *Nothobranchius* (Lucas-Sánchez et al. 2013). Depuis ce modèle s'implante de plus en plus parmi les autres modèles animaux (Mitchell et al. 2015).

Comme mentionné en introduction, l'étude du vieillissement constitue un défi socio-économique. La compréhension des mécanismes biologiques, à l'échelle cellulaire et moléculaire, l'origine des maladies liées au vieillissement pourrait permettre de développer une stratégie de prise en charge précoce voire thérapeutique des populations vieillissantes. Cependant, afin de travailler sur le vieillissement, la condition *sine qua non* est d'attendre que les modèles animaux développent des manifestations physiques (*amyotrophie, ...*), cliniques (*troubles cognitifs, locomoteurs, ...*), associées au vieillissement. Seulement, les modèles classiquement utilisés, la souris et le poisson-zèbre, ont une durée de vie moyenne de 3 à 4 ans. Ce temps, incompressible, ralentit considérablement la progression des connaissances et les avancées scientifiques dans le domaine des géosciences, alors même que celles-ci permettraient d'entrevoir des perspectives thérapeutiques.

N. furzeri se distingue alors des modèles classiques par sa courte durée de vie, qu'il maintient en captivité. Cela permet alors de multiplier le nombre de poissons dans une étude sur une période plus courte que pour les autres modèles (Figure 9).

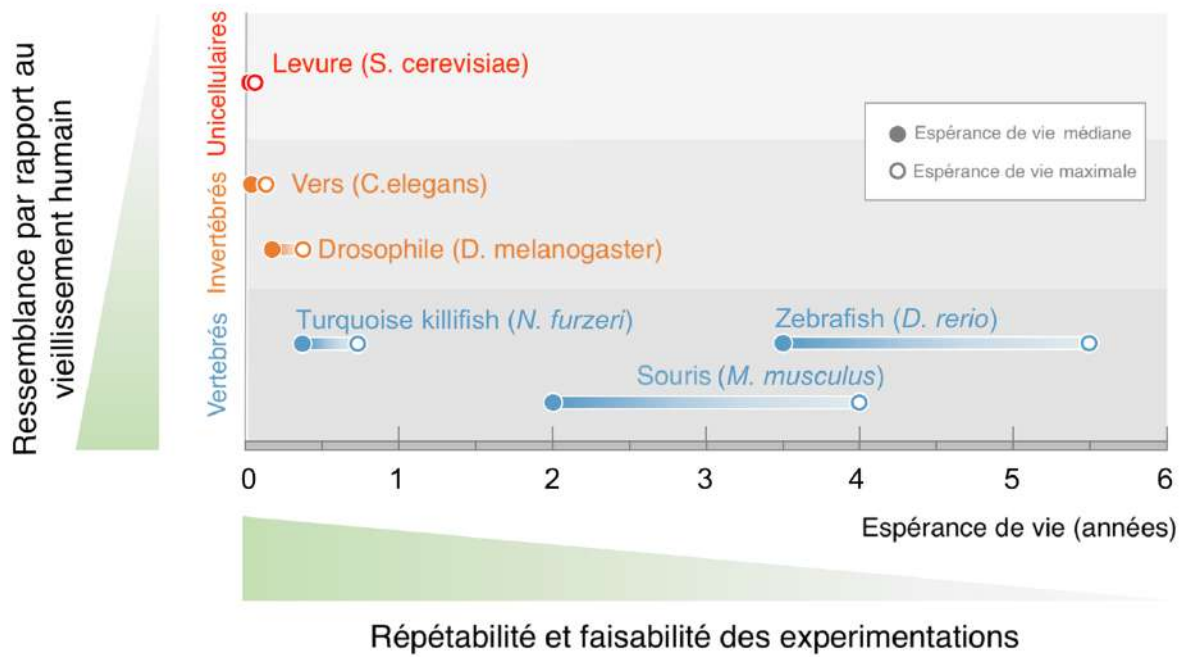
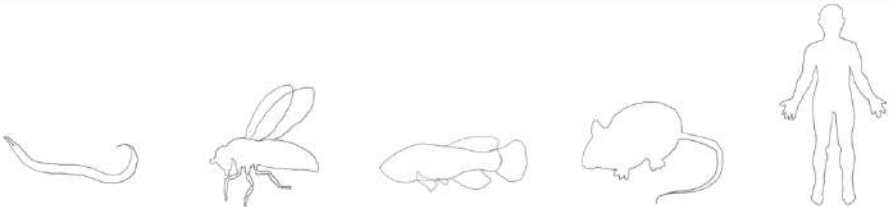


Figure 9 : Graphique représentant les durées de vie médianes et maximales des modèles animaux utilisés dans les études sur le vieillissement comparé à l'Homme (modifié d'après Hu, Brunet 2018).

Sa durée de vie étant d'environ 6 mois en laboratoire, cela fait de *N. furzeri* le modèle d'étude comparée avec la plus courte espérance de vie à ce jour (Valenzano et al. 2017). Ensuite, bien que très brève, *N. furzeri* présente au cours de sa vie tous les signes du vieillissement également décrit chez les mammifères comme la perte musculaire, le déclin de la fertilité ou les déficits cognitifs (Brunet 2020a). *N. furzeri* est un modèle qui connaît au cours de son vieillissement les mêmes mécanismes moléculaires que chez l'Homme, notamment le raccourcissement des télomères, le dysfonctionnement des mitochondries ou la sénescence cellulaire (Mazzetto et al. 2022).

Son cycle de vie court n'est pas son seul atout en temps qu'animal de recherche dans les études du vieillissement comparé. En effet, d'autres modèles animaux présentent cet avantage technique comme les unicellulaires ou la drosophile, mais *N. furzeri* se rapproche bien plus, sur de nombreux aspects, de l'Homme (Figure 10).



	Vers <i>C. elegans</i>	Drosophile <i>D. melanogaster</i>	Killifish / poisson-zèbre <i>N. furzeri / D. rerio</i>	Souris <i>M. musculus</i>	Humain <i>H. sapiens</i>
Système nerveux	Systèmes nerveux central et périphérique				
	Encéphale segmenté : prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale				
	Axe hypothalamo-hypophysaire				
Système immunitaire	Immunité innée				
	Immunité adaptative				
Système circulatoire	Circulation ouverte		Circulation fermée		
Système respiratoire	Trachée		Banchies	Poumons	
Muscles	Os et cartilage				
Squelette	Semblables aux muscles squelettiques		Muscles striés squelettiques, cardiaques et lisses		
	Aucune distinction	Fibres lentes ou rapides	Fibres lentes et rapides		
Système digestif Tractus digestif Centre métabolique Stockage graisseux Microbiote	Intestin				
	Intestin	Oenocyte et tissu adipeux	Foie		
	Granules graisseux	Adipocytes	Adipocytes		
	Pas en laboratoire	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies		
Système excréteur	Cellule excrétrice et canal	Néphrocyte/tube de Malpighi	Reins		
Système de reproduction	Mâle/hermaphrodite	Mâle / Femelle			
	Oviparité			Viviparité	
Cycle circadien	Léthargie		Sommeil		
		Diurne	Diurne	Nocturne	Diurne
Autres Tégument Thermorégulation Cellules souches/somatiques	Cuticule		Peau et écailles	Peau et poils	
	Ectotherme			Endotherme	
	Limités aux tissus spécifiques		Abondant		

Figure 10 : Tableau récapitulatif des différences et similarités rencontrées entre les différents animaux de laboratoire utilisés en tant que modèles dans l'étude du vieillissement comparé (D'après Hu, Brunet 2018).

À l'inverse des invertébrés, ce petit poisson possède un compartiment de cellules souches permettant l'exploration d'autres mécanismes du vieillissement (Valenzano et al. 2017).

Par rapport aux invertébrés, la figure précédente montre que, de manière générale, les systèmes et tissus se rapprochent beaucoup de l'Homme sauf pour quelques-uns. Cela permet donc d'étudier le vieillissement à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire sans oublier l'aspect comportemental (Reuter et al. 2018).

D'autre part, le génome et le transcriptome de *N. furzeri* sont entièrement cartographiés (Valenzano et al. 2015) et il est relativement facile d'effectuer des transgénèses sur

Nothobranchius à partir des embryons. La cartographie du génome permettra de comprendre différents aspects du vieillissement des *Nothobranchius* dont leur maturation extrêmement rapide, leur transformations morphologiques et l'apparition des cancers ou de neuropathies (Brunet 2020b).

2. Particularité du modèle en captivité

Les études concernant le vieillissement et ses mécanismes reposent, comme il a été mentionné dans les précédentes parties, sur l'utilisation de différents modèles animaux. Cependant, la majorité des données collectées le sont sur des animaux vivant en laboratoire, dans un milieu contrôlé dans lequel ils ne subissent ni aléas environnementaux ni de risque biologique lié à la présence de pathogènes et où leur ration est différente de celle qu'ils auraient dans leur milieu naturel, à la fois en composition et en fréquence (Mazzetto et al. 2022). Dans ces conditions, les animaux profitent alors d'apports nutritifs conséquents garantissant une croissance et un développement rapide mais ce milieu, restrictif, n'offre pas de stimulations sensorielles naturelles et ne permet pas aux modèles d'avoir une activité physique suffisante (van Praag, Kempermann, Gage 2000).

Comme chez les autres modèles, *N. furzeri* est soumis à ces différences d'environnement. Il faut également souligner que les conditions de vie libre sont également difficiles à connaître précisément et donc à reproduire. Cependant, il conserve sa caractéristique principale qui est sa courte durée de vie, même si celle-ci reste augmentée. Dans le milieu naturel, la souche GRZ survit environ 3 mois (Baumgart et al. 2015), tandis qu'en captivité, on observe des individus de plus de 7 mois, y compris chez RESTORE.

D'un point de vue pratique, il est enfin crucial de souligner que le maintien en captivité et la reproduction des *Nothobranchius* sont relativement aisés en laboratoires et moins coûteux que l'élevage d'autres vertébrés, surtout des rongeurs.

PARTIE II - EXPÉRIMENTALE

ÉLABORATION D'UN ATLAS HISTOLOGIQUE DE
NOTHOBRANCHIUS FURZERI

I. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

A. Les gérosiences, le consortium INSPIRE et l'IHU HealthAge

Le domaine des gérosiences est en plein essor dans le monde entier. Ce champ d'étude a vu le jour dans un effort de compréhension des mécanismes biologiques du vieillissement dans le but d'améliorer la santé des personnes âgées. Les projets menés intéressent énormément la communauté scientifique et les États-Unis et l'Europe investissent massivement pour étendre nos connaissances dans ce domaine.

Le projet INSPIRE renforcé par l'IHU HealthAge sont dirigés par le Gérontopôle du CHU de Toulouse, en association avec ses partenaires publics – l'Université Paul Sabatier, l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – et privés. Ce projet, soutenu par la région Occitanie, puis par le programme national « Accélérer notre recherche en santé » de France 2030, consiste en une approche globale de la prise en charge thérapeutique et hygiénique du patient âgé dans le but d'améliorer ou de maintenir les fonctions physiologiques et l'état de santé.

Le Gérontopôle est un centre collaborateur de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Sierra, Vellas 2021). Le projet INSPIRE a reçu un appui financier de la part de la région Occitanie et du Fond Européen de Développement Régional (FEDER) et la somme déployée sur dix ans est estimée à 57 millions d'euros, renforcé par les financements attribués à l'IHU HealthAge. Cet investissement doit permettre l'émergence d'une plateforme de recherche, de soins et d'innovation complète autour du vieillissement. Elle va rassembler des données biologiques, cliniques, digitales et d'imagerie sur l'Homme et sur les animaux des cohortes miroirs.

B. Les cohortes au cœur des études fondamentales et translationnelles

Plusieurs cohortes sont à ce jour incluses dans ce vaste projet de recherche. Parmi elles on retrouve une cohorte humaine, une cohorte murine et une cohorte de *N. furzeri*.

La cohorte humaine comprend environ 1000 sujets volontaires âgés de 20 ans et plus dont le suivi médical est prévu pour une période de 10 ans. Le recrutement a débuté en octobre 2019. Ce suivi consiste en une visite médicale et un monitoring électronique grâce à une application créée par le gérontopôle du CHU de Toulouse : Icope monitor© (Sierra, Vellas 2021). Cette application mobile permet de prévenir le déclin des fonctions vitales chez les individus âgés. À leur entrée dans l'étude, les hommes et femmes incluses sont classés selon leur statut robuste ou fragile vis-à-vis de leur état de santé général et de leurs habitudes de vie (De Souto Barreto et al. 2021).

La cohorte murine (*Mus musculus*) doit répondre à différents objectifs :

- Caractériser la fragilité de la souris grâce à différents paramètres afin d'aboutir à la création d'un score de fragilité. Certaines souris subissent donc un vieillissement accéléré induit par certains facteurs de risque précis comme la sédentarité, le manque d'activité physique, le surpoids voire l'obésité.
- Corréler la fragilité fonctionnelle aux marqueurs biologiques du vieillissement
- Identifier de nouveaux biomarqueurs et cibles pharmacologiques de la fragilité afin de prévenir et traiter ce phénomène et donc ralentir le vieillissement.

Cette cohorte a pour but de mimer l'hétérogénéité de la population humaine. C'est pourquoi ce sont des souris Swiss (non consanguines) qui sont étudiées. Plus de 1500 souris seront intégrées à l'études. Cette cohorte représente alors l'une des 3 plus grandes cohortes animales sur le vieillissement au monde avec celles du National Institute of Aging (NIA) à Baltimore et de Calico (California Life Company) fondé par Google en Californie, toutes deux aux États-Unis. Les âges d'intérêt des souris sont définis comme étant 6, 12, 18 et 24 mois. Ces âges sont censés correspondre approximativement à 30, 42, 56 et 69 ans chez l'Homme. Au cours de l'étude, des suivis d'activités seront réalisés (De Souto Barreto et al. 2021). L'évaluation des capacités fonctionnelles permettra un phénotypage des individus puis des échantillons de selles, d'urine et de sang seront récoltés afin de générer une banque de données (Guyonnet et al. 2021).

Une cohorte canine pourrait voir le jour dans les locaux de l'ENVY. Elle pourrait s'intégrer par sa complémentarité et sa synergie avec la cohorte de recherche translationnelle humaine, INSPIRE-T, d'une part et avec les autres cohortes animales d'autre part. Le chien de compagnie possède en effet une physiologie comparable à l'Homme et donc un vieillissement physique et comportementale semblable également. Le principal enjeu de cette cohorte serait d'identifier des biomarqueurs du vieillissement, des marqueurs pertinents associés aux maladies liées à l'âge ou à la fragilité chez le chien qui puissent être transposables à l'Homme ainsi que de comprendre les mécanismes et le déterminisme du vieillissement biologique (INSPIRE, CHU Toulouse).

Enfin, le projet INSPIRE inclut une cohorte de *N. furzeri* qui est un modèle pertinent pour suivre le vieillissement de manière accélérée. Elle est hébergée dans une zootechnie dédiée, dans les locaux de l'institut RESTORE. Son rôle dans les études sur le vieillissement est de valider la connaissance de certains mécanismes et de tester de nouvelles hypothèses isolées. Certaines conditions pouvant favoriser l'apparition soudaine du vieillissement chez l'Homme seront imposées à *N. furzeri* au cours de l'étude afin de mimer les processus de vieillissement. La durée, la fréquence et l'intensité des exercices, le jeûne ou les régimes hypercaloriques sont autant de paramètres qui font varier la vitesse d'évolution du vieillissement chez l'Homme. Les comportements locomoteurs et cognitifs des *Nothobranchius* seront enregistrés par vidéo en parallèle de l'examen des fonctions métaboliques, immunitaires et régénératives. Les expérimentations seront effectuées chez les individus mâles et femelles âgés de 1 à 6 mois (De Souto Barreto et al. 2021).

C. Objectifs de la construction d'un atlas

Malgré leur récente implication et les avancées innovantes permises par l'utilisation de *N. furzeri* dans le domaine des géosciences, une question demeure et concerne les causes à l'origine de leur décès. Cette interrogation importante a fait l'objet d'une étude menée en 2011 qui suggérait alors que la majorité des décès étaient corrélés à la présence de tissus néoplasiques (Di Cicco et al. 2011). Cependant, cette étude est remise en question car elle date d'une période où *Nothobranchius* n'était présent que dans un nombre restreint de laboratoire. Actuellement, son utilisation bien plus répandue et les conclusions ne confirment pas les résultats présentés en 2011.

Il convient, afin de mieux répondre aux questions relatives à l'histolophysologie et histopathologie de *N. furzeri*, et d'éviter les conclusions erronées pouvant être expliquées par un échantillon pas assez représentatif, de disposer d'un certain nombre de données exploitables. C'est dans ce sens qu'un consortium a été créé, rassemblant des laboratoires hautement qualifiés disposant d'une expertise complémentaire en histopathologie. Cela permettra à terme de collecter un grand nombre d'individus, mâles et femelles, à différents âges en un court laps de temps. Six vétérinaires seront en charge de caractériser les structures anatomiques et de décrire les éventuels changements pathologiques au sein des tissus au cours du vieillissement.

Concrètement, les objectifs du consortium sont d'abord de collecter et d'étudier les *nothobranchius* des 2 sexes à tout âge et issus des fonds génétiques GRZ et MZM, en réalisant des coupes histologiques colorées puis numérisées. Puis de référencer et d'annoter les lames numérisées pour chaque sexe, âge et fond génétique. Enfin, ce consortium souhaite créer un atlas d'anatomo-pathologie pour *N. furzeri* dans lequel toutes les structures anatomiques seraient annotées ainsi que les évolutions pathologiques. L'intérêt de cet atlas résidera dans le fait d'être accessible par l'ensemble de la communauté scientifique et d'être ouvert à une implémentation et des annotations collaboratives. Cette thèse initie donc ce travail de caractérisation histologique et d'atlas virtuel en ligne.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Élevage et prélèvement des poissons au sein de l'institut RESTORE

L'institut dispose d'une zootechnie poisson qui héberge des animaux issus de différents fournisseurs basés en Allemagne et plus récemment en Belgique. Elle comprend actuellement 195 bacs filtrés pouvant accueillir la population de *Nothobranchius* et d'y créer les nouvelles générations. Pour l'instant, l'institut ne dispose que de poissons issus du fond génétique GRZ.

Les poissons sont placés individuellement dans les bacs car des comportements de prédations sont rapportés et constatés entre les individus mâles. La cohabitation n'a pas été testée chez les femelles mais afin de lisser les conditions d'hébergement des animaux, ils sont seuls en bac. Seuls les poissons mis à la reproduction sont plus nombreux par bac. Ils sont alors trois, deux femelles et un mâle.

L'alimentation quotidienne est adaptée à l'âge du poisson et se compose d'artemias élevées au sein du laboratoire. Les individus de plus grande taille (à partir de 4-6 semaines) reçoivent aussi des vers de vase, la taille de leur tube digestif permettant la digestion d'aliments plus gros.

Les poissons sont identifiés et leur date de naissance est indiquée sur chaque bac nous permettant ainsi de connaître avec certitude l'âge de chacun et donc de choisir les individus à intégrer à notre étude. Seuls les poissons sacrifiés sont prélevés pour réaliser les coupes histologiques. En effet, lorsque la mort des poissons survient de manière « naturelle », sans l'action de l'homme, le risque d'autolyse tissulaire est accru.

L'euthanasie des *Nothobranchius* est réalisée en les plongeant dans un bain d'eau glacée, une technique approuvée d'un point de vue éthique et pour laquelle le laboratoire a obtenu le droit de mise en œuvre. Les manipulations sur les poissons se doivent de respecter des protocoles veillant à assurer leurs soins et leur prise en charge éthique imposés par le comité d'éthique de l'US-006 du centre régional d'exploration fonctionnelle et de ressources expérimentales (CREFRE).

B. Population d'étude

1. Animaux inclus dans l'atlas

	Référence ENVT	Âge	Réception ENVT	Cause du décès
Mâle	22-0108	1 mois	02/07/2022	Euthanasie
	23-0461	2 mois	21/04/2023	Euthanasie
	23-0460	2 mois	21/04/2023	Euthanasie
	22-0696	3 mois	30/06/2022	Euthanasie
	22-0609	3 mois	31/05/2022	Euthanasie
	22-0109	5 mois	02/07/2022	Euthanasie
	22-1053	6 mois	27/10/2022	Euthanasie
	22-1056	6 mois	27/10/2022	Euthanasie
	22-1040	7 mois	27/10/2022	Euthanasie
Femelle	23-0464	1 mois	21/04/2023	Euthanasie
	22-0697	3 mois	30/06/2022	Euthanasie
	22-1063R1	4 mois	27/10/2022	Euthanasie
	22-1063R2	4 mois	27/10/2022	Euthanasie
	22-0695	5 mois	30/06/2022	Euthanasie
	23-0463	5 mois	21/04/2023	Euthanasie
	22-1047	6 mois	27/10/2022	Euthanasie
	22-1049	7 mois	27/10/2022	Euthanasie
	23-0591	7 mois	17/05/2023	Euthanasie
	22-1041	8 mois	27/10/2022	Euthanasie

Figure 11 : Tableau récapitulatif des poissons inclus dans l'étude.

Ces animaux ont été retenus car leur histologie a été jugée physiologique. Il faut cependant souligner que l'intégrité des tissus n'est pas toujours idéalement préservée. Pour certains, les tissus comme les branchies et la paroi intestinale, qui sont les premiers à être concernés par les processus post mortem d'autolyse et de putréfaction, sont altérés mais le reste des organes peut tout à fait être annoté.

2. Animaux exclus de l'atlas

	Référence ENVT	Âge	Critère d'exclusion
Mâle	22-0604	3 mois	Présence d'une nécrose associée à la présence de bactéries
	22-1062	3 mois	Autolyse trop importante
	22-0606	4 mois	Abcès dans la cavité abdominale et présence suspectée d'éléments fongiques
	23-0078	4 mois	Autolyse trop importante
	23-0077	3 mois	Hémorragie
	22-0497	5 mois	Pathologie néoplasique probablement multicentrique
	22-1055	5 mois	Problème technique : malposition du poisson dans le bloc de paraffine, tégument apparait au milieu de la cavité abdominale
	22-0699	5 mois	Autolyse trop importante
	22-1043	7 mois	Autolyse trop importante
Femelle	22-0610	2 mois	Amas de cellules anormales au niveau cardiaque et splénique
	22-0605	4 mois	Autolyse foie et nécrose rénale
	22-0607	4 mois	Autolyse trop importante
	22-1064	4 mois	Autolyse trop importante et problème technique, chevauchement des tissus
	23-0462	5 mois	Autolyse trop importante
	23-0084	6 mois	Autolyse trop importante et défaut de coloration

Figure 12 : Tableau récapitulatif des poissons exclus de l'étude et des motifs d'exclusion.

C. Réalisation des coupes de *Nothobranchius furzeri*

1. Fixation des échantillons

La fixation est une étape clé dans la réalisation de coupes histologiques car de sa bonne mise en œuvre dépend la qualité de préservation des tissus. Afin qu'elle soit réalisée le plus précocement possible après l'euthanasie et afin de s'assurer de la standardisation du fixateur, l'ENVT le fournit au laboratoire RESTORE. Le fixateur utilisé est du formol à 10% tamponné à la neutralité de qualité histologique conservé à température ambiante.

L'immersion des poissons doit se faire de manière immédiate dans un grand volume de fixateur en suivant l'euthanasie (un volume d'échantillon pour 9 volumes de fixateur).

La durée de fixation est fixée à 48 heures. On considère que ce temps peut être légèrement réduit de moitié pour les individus de petite taille ou de faible épaisseur.

2. Décalcification

Dans l'optique de réaliser des lames histologiques, les poissons à échantillonner doivent systématiquement subir une étape de décalcification afin de ramollir les tissus cartilagineux de manière à faciliter la coupe. Elle se compose des étapes suivantes (Annexe 1):

- Après 48 heures de fixation, les poissons sont rapidement rincés au PBS 1X en réalisant 3 immersions suivies et rapides.
- Transfert des poissons dans une solution d'EDTA à 10% dans l'étuve à 37°C pendant 10 jours.
- Agitation des contenants de solution d'EDTA durant 30 secondes quotidiennement. Un changement de solution est réalisé au bout de 5 jours.
- Rinçage à l'eau au bout de 10 jours avant de faire partir l'automate d'imprégnation en paraffine (cycle de 15 heures toute la nuit)
- Mise en bloc à la station d'enrobage

3. Découpe

Une fois la mise en bloc réalisée, les échantillons sont prêts à être coupés puis les coupes placées sur lames de verre. La coupe et le dégrossissement des blocs sont effectués sur un microtome. L'objectif des coupes est d'obtenir un visuel sur les organes du poisson. Les viscères étant disposés de manière définie dans la cavité abdominale, différents niveaux de coupes sont successivement nécessaires afin de balayer les organes (figure 13).

Le pas de coupe a été fixé en tenant compte des dimensions du poisson, qui dépendent majoritairement de son âge, et du nombre de niveaux de coupes attendus ainsi que du nombre de coupes nécessaires par niveau.

Le pas de coupe est donc défini arbitrairement en fonction de l'épaisseur du poisson. Pour la construction d'un atlas, nous avons estimé que 15 à 20 niveaux successifs et espacés seraient suffisants pour balayer les organes d'intérêt. Cela permet ensuite de choisir les dix niveaux les plus représentatifs. Le pas de coupe estimé pourrait donc être défini comme le rapport de l'épaisseur dorso-ventrale de l'animal sur le nombre de niveaux désiré.

Exemple : En simplifiant, si l'épaisseur dorso-ventrale d'un poisson de 5 mois est d'environ 1 centimètre, l'épaisseur utile (celle dans laquelle on retrouve les organes) représente généralement $\frac{3}{4}$ de l'épaisseur totale soit environ 0,75 cm. Alors pour obtenir une vingtaine de coupes, il faudra réaliser un intervalle, ou pas de coupe de :

$$\frac{\text{épaisseur}}{20} = \frac{7500}{20} = 375 \mu\text{m}$$

Il faut noter que cela est une estimation nous permettant de démarrer le travail de coupe mais ce pas peut être ajusté au fil des découpes, selon les observations.

Ce pas est ensuite légèrement réduit afin de ne pas manquer de tissus et afin de tenir compte du fait que la portion dorsale est assez épaisse et composée seulement de muscles et la portion ventrale peut être riche en graisse abdominale. Il faut donc souvent dégrossir avant que soient révélés les organes en coupe.

D'autre part, la morphologie et topographie des organes pouvant varier d'un individu à l'autre, une fois un pas de coupe estimé, nous vérifions tous les 2 ou 3 niveaux de coupes l'avancée afin de ne pas manquer une affection ayant des répercussions tissulaires et afin de pouvoir caractériser au mieux ces organes. Il est notamment important de souligner que la conformation anatomique est différente entre les mâles et les femelles (Figure 13).

Le schéma suivant illustre les niveaux de coupes réalisés pour cette première partie d'atlas :

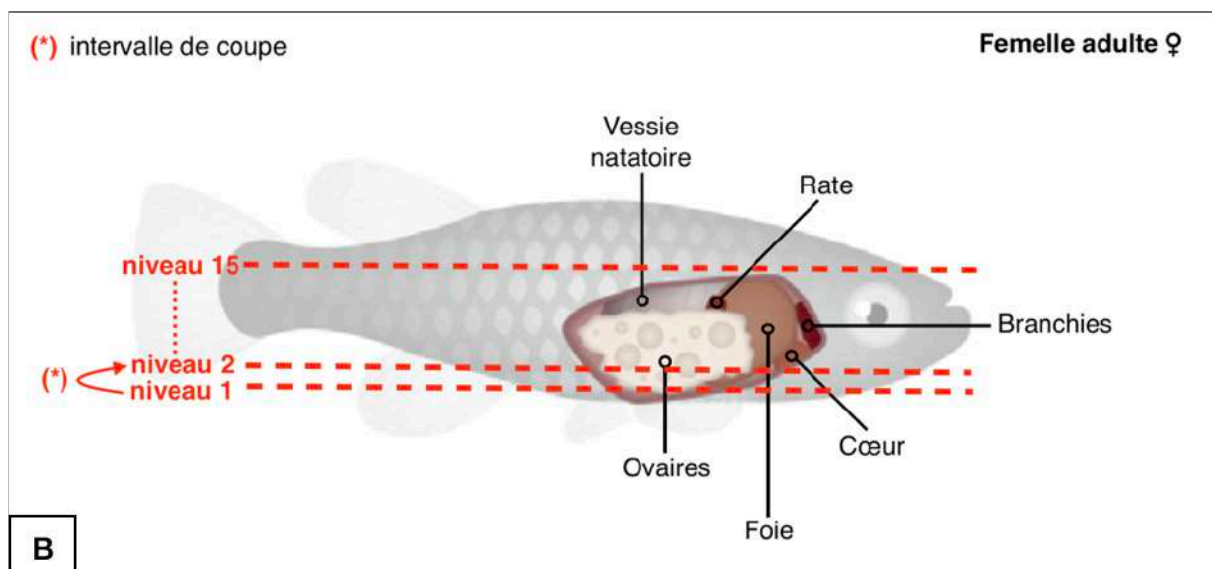
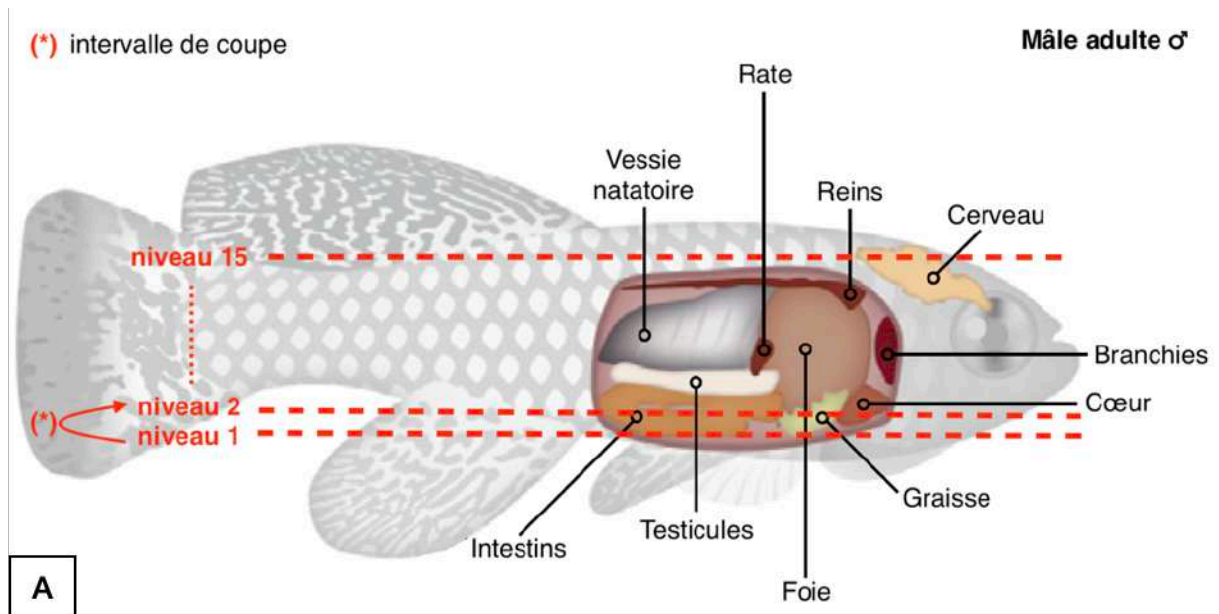


Figure 13 : Dessin de l'anatomie topographique de *N. furzeri* mâle (A) et femelle (B) et représentation schématique des plans de coupe (trait pointillé rouge) avec l'intervalle de

$$\text{coupe correspondant à } (*) = \frac{\text{épaisseur}}{15}.$$

(Modifié à partir de D'angelo, De Girolamo 2021).

Enfin, ce travail n'étant que le prélude d'une étude beaucoup plus vaste sur les tissus de *N. furzeri*, il fallait réaliser plusieurs coupes par niveau afin de pouvoir comparer des images avec d'autres colorations. En effet, les différentes colorations permettent de caractériser les tissus et les éventuelles lésions observées. En comptant le fait de conserver une lame blanche, cinq coupes sont donc réalisées à chaque niveau de coupe et une seule est colorée et utilisée pour la création de l'Atlas. Les autres serviront aux futurs projets d'étude.

4. Coloration

Dans le cadre de la construction d'un atlas histologique, la coloration utilisée dans cette étude est celle classiquement retrouvée en histologie, l'hémalum-éosine.

L'hématoxyline est un colorant basique, ayant une affinité pour les anions. Il colore donc en violet les protéines, notamment les acides nucléiques. L'éosine est un colorant acide ayant une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement, les cations. Il colore ces éléments en rose et rouges de manière plus ou moins franche selon leur acidophilie. Le cytoplasme est une structure acidophile.

La coloration est réalisée par un automate qui réalise les étapes suivantes (voir annexe 1) :

Préparation à la coloration

- Déparaffinage au toluène pendant 5 minutes
- Réhydratation dans un premier bain d'alcool à 100% pendant 5 minutes
- Réhydratation dans un second bain d'alcool à 96% pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes avant d'éponger les lames

Coloration

- Bain d'hémalum pendant 3 minutes puis rinçage dans un bain d'eau ammoniacé (quelques gouttes) puis rinçage à l'eau courante
- Bien égoutter les lames
- Bain d'éosine pendant 20 secondes suivi d'un rinçage rapide dans un bain d'eau
- Nouvelle coloration à l'hémalum pendant 20 à 30 secondes puis rinçage à l'eau jusqu'à éclaircissement du bain
- Dégorger l'éosine dans l'alcool à 96% jusqu'à intensité désirée
- Passage dans l'alcool absolu, puis dans le toluène
- Montage en baume

D. Traitement de l'image

Une fois l'ensemble des coupes réalisées pour un poisson donné, les lames colorées sont numérisées à l'aide d'un scanner Desk panoramic 3D Histec®.

Toutes les écoles vétérinaires françaises possèdent un cytomine© dédié à la formation vétérinaire et celui de l'ENVT a été utilisé pour ce travail de thèse. Il s'agit d'un site internet qui héberge une base de données importante d'images d'histologie animale annotées. Il est spécifiquement construit de manière à pouvoir facilement naviguer sur l'image à plusieurs grossissements et d'y ajouter des annotations. Les lames numérisées ont été ajoutées dans un nouvel espace virtuel de travail dédié à l'histologie de *N. furzeri* et ont pu être annotées. Elles pourront ultérieurement être déplacées sur une nouvelle plateforme dédiée à la cohorte de *Notobranchius*.

Toutes les images sont annotées. L'objectif est que tous les organes et tissus soient légendés de manière précise au moins une fois par poisson tant que la conservation et qualité de l'échantillon le permettent. La coupe sur laquelle un organe apparaît le mieux est sélectionnée pour annoter cet organe.

III. ATLAS HISTOLOGIQUE PAR SYSTÈMES

A. Anatomie générale

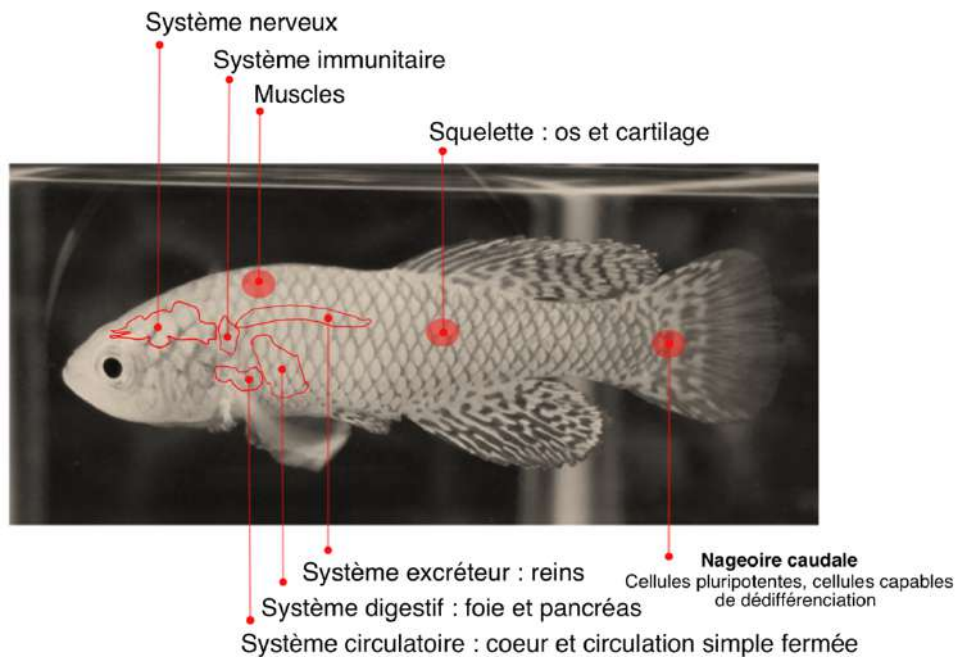


Figure 14 : Photographie légendée indiquant la topographie systémique générale chez N.furzeri sur une vue de profil (Hu, Brunet 2018)

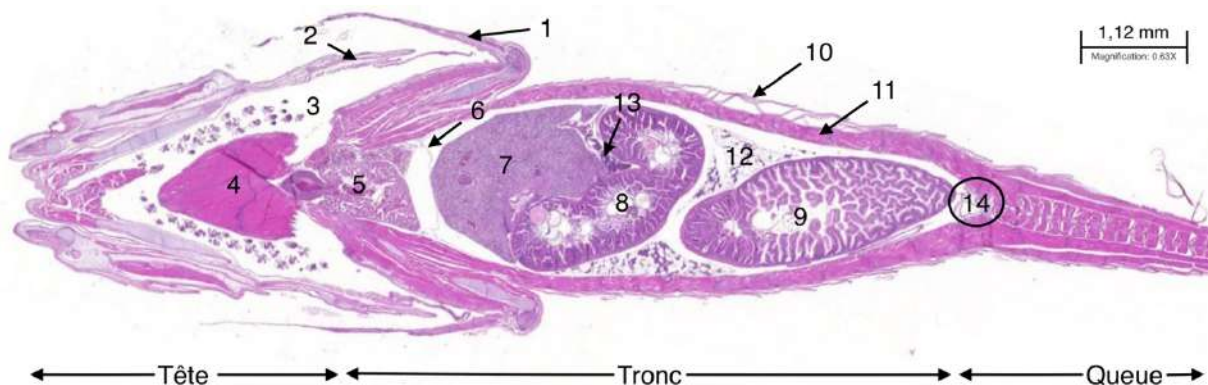


Illustration 1 : Histologie topographique de N. furzeri (mâle de 1 mois), partie ventrale légendée indiquant la topographie viscérale générale (HE). (1) nageoire pectorale repliées vers l'avant, (2) opercule, (3) cavité branchiale, (4) muscles de la langue, (5) cœur, (6) péritoine, (7) foie, (8) intestin grêle, (9) rectum, (10) écailles, (11) paroi musculaire abdominale, (12) graisse abdominale, (13) pancréas diffus, (14) orifices uro-génitaux

B. Tégument

La peau constitue la première barrière contre l'environnement immédiat dans lequel vit *Nothobranchius* et elle comporte, comme chez la majorité des vertébrés, une succession de couches (Figure 15).

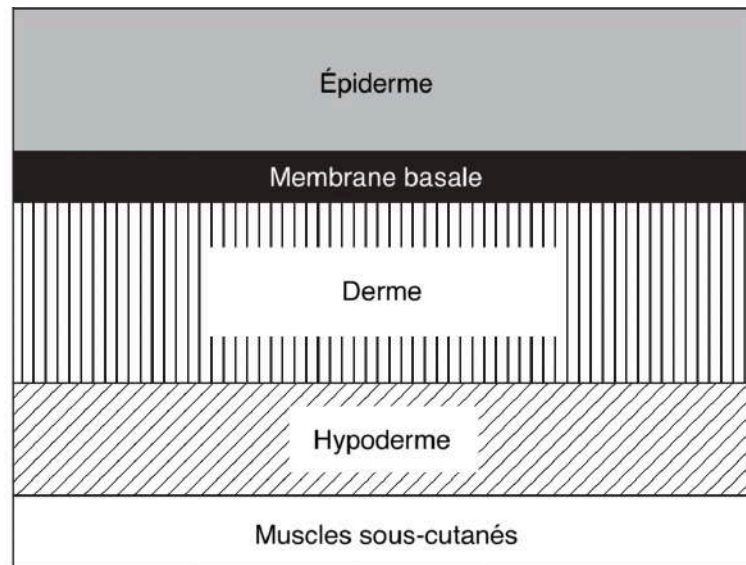


Figure 15 : Diagramme schématique des couches tégumentaires chez N.furzeri (Roberts, Ellis 2012)

1. Épiderme

L'épiderme est d'origine ectodermique. Il se situe au-dessus des écailles et recouvre l'intégralité du corps du poisson. Il est qualifié de pluristratifié non kératinisé et repose sur une membrane basale. L'épiderme est constitué de différents types cellulaires (Genten et al. 2010):

- Les cellules de soutien ou épithéliales basales (de Malpighi) sont organisées en une couche monocellulaire de cellules cubiques
- Les cellules muqueuses, qui sont des glandes unicellulaires sphériques présentant un noyau basal et un cytoplasme qui se remplit peu à peu de vésicules du mucus. Elles sont les premières responsables de la sécrétion de la cuticule.

- Les cellules à « alarme », généralement arrondies et de grande taille. Ces cellules interviennent dans les mécanismes de fuite. En cas de blessure d'un congénère, provoquée par un prédateur par exemple, les cellules peuvent être atteintes et la substance alarme spécifique d'espèce contenue dans ces cellules alerte les autres poissons qui fuient. Cette substance est un phéromone (Enjin, Suh 2013). (*Ce type cellulaire est décrit mais n'a pas été clairement identifié sur nos poissons.*)

L'épithélium de la cavité buccale comme celui du pharynx est particulier car il abrite des bourgeons gustatifs. Il s'agit d'un organe sensoriel qui se présente sous la forme d'un amas de cellules sensorielles (Facey and al. 2023).

2. Derme et hypoderme

Le derme est d'origine mésodermique, il s'agit d'un tissu conjonctif fibreux aglandulaire constitué essentiellement par une couche compacte (*stratum compactum*) qui contient des faisceaux de fibres de collagène serrées et entrecroisées ainsi que quelques fibres élastiques (Genten, Terwinghe, Danguy 2010). Il peut également contenir des fibrocytes, des cellules immunitaires et des chromatophores, des cellules pigmentaires en forme d'étoile irrégulière donnant à certains poissons, comme *N. furzeri*, leur couleur. C'est aussi le derme qui renferme les écailles. Celles-ci sont moins minéralisées que les os du squelette, sont acellulaires et calcifiées, et ont le rôle de plaque protectrice (Facey and al. 2023).

L'hypoderme est un tissu lâche, situé entre le derme et les couches squelettiques ou musculaires (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

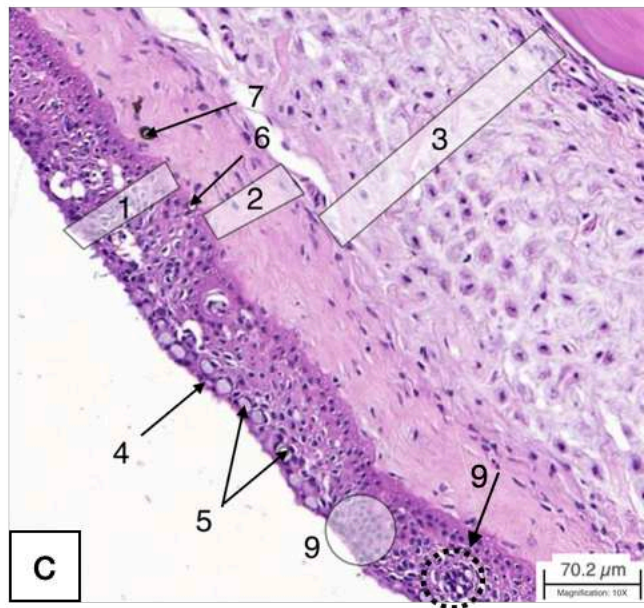
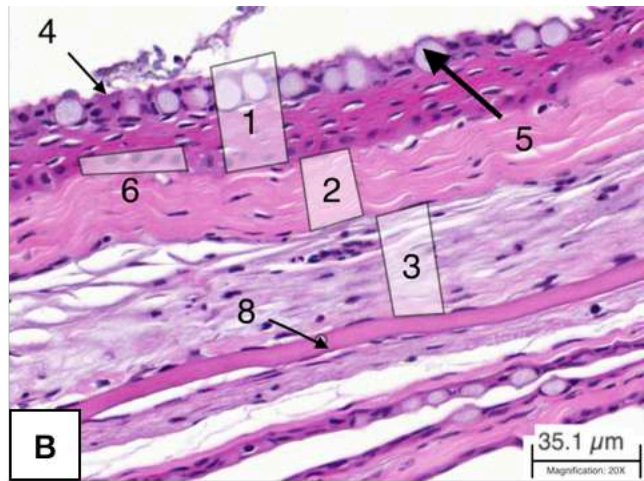
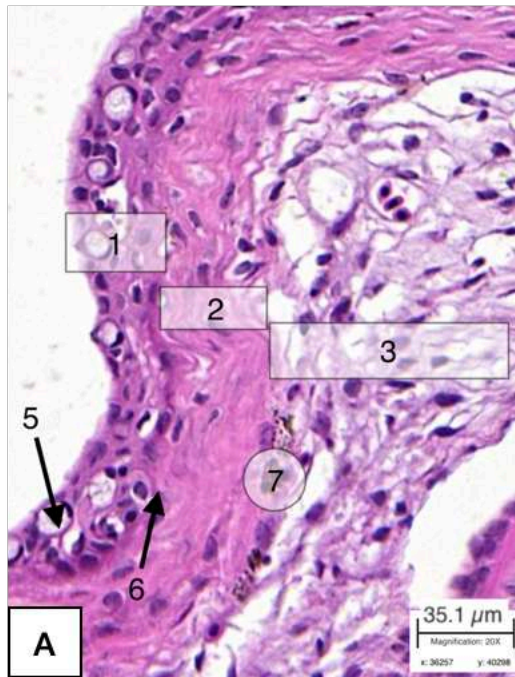


Illustration 2 : Coupes longitudinales de tégument de la tête de N. furzeri d'un mâle de 1 mois (A), d'une femelle de 3 mois (B) et d'un mâle de 6 mois (C) (coloration HE).

(1) épiderme, épithélium squameux stratifié, (2) derme = stratum compactum, (3) hypoderme, tissu conjonctif aréolaire, (4) cellule épithéliale, (5) cellule à mucus, (6) lame basale, (7) mélanocytes, (8) écaille, (9) bourgeon gustatif

C. Système cardio-vasculaire

Les poissons possèdent pour la grande majorité une circulation simple, en système clos. C'est le cas de *N. furzeri*.

1. Cœur

Le sang circule du cœur vers les branchies où il se charge en dioxygène par diffusion à travers l'épithélium lamellaire. Le cœur des téléostéens prend place crânialement à la cavité abdominale et est composé de 4 cavités entourées par le péricarde (Roberts, Ellis 2012) (Figure 16). Ces cavités, toutes contractiles, sont :

Le sinus veineux est une chambre habituellement souple ne possédant pas de valvule à l'entrée. Il est caractérisé par une paroi très fine. Le sang provenant du corps est drainé en partie par les veines cardinales antérieures et postérieures qui se réunissent pour former les canaux de Cuvier que l'on retrouve de part et d'autre de l'œsophage. Les veines sus-hépatiques ont également la charge du drainage du sang provenant des viscères (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

Le ventricule est limité par une paroi relativement épaisse doublée d'un myocarde imposant spongieux et trabéculaire. Le sang circule alors dans le ventricule seulement au sein des lacunes formées par le réseau de trabécules (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

L'atrium est un sac extensible, plurilobé, de forme irrégulière possédant une paroi mince. Il recouvre dorsalement le ventricule cardiaque. Il est séparé du ventricule par les valvules atrio-ventriculaires (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

Le bulbe artériel joue le rôle de réservoir hautement élastique. La paroi est composée d'un tissu conjonctif élastique. Il est dépourvu de valvules et constitue la base élargie et épaissie de l'aorte ventrale (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

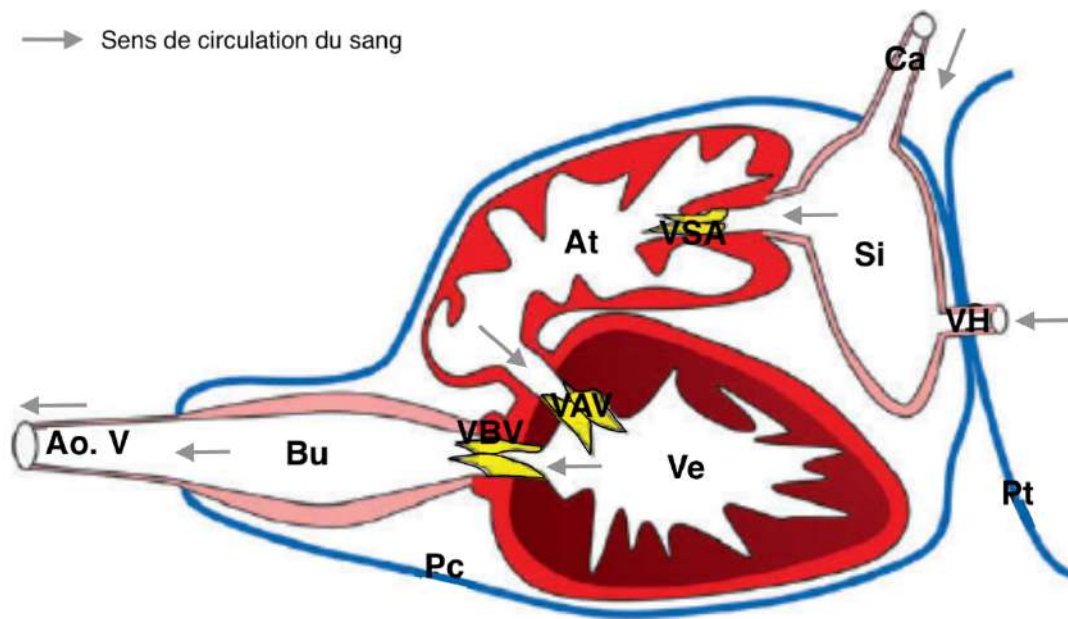


Figure 16 : Schéma de l'anatomie du cœur des téléostéens en coupe sagittale (Farrell, Pieperhoff 2011) : (Ca) Canal de Cuvier, (VH) veine hépatique, (Si) Sinus veineux, (VSA) Valve sino-atriale, (At) Atrium, (VAV) Valve atrio-ventriculaire, (Ve) Ventricule, (VBV) Valve bulbo-ventriculaire, (Bu) Bulbe artériel, (Ao.V) Aorte ventrale, (Pc) Péricarde, (Pt) Péritoine.

2. Artères

L'aorte ventrale évolue entre le cœur et les branchies et les irrigue via les artères afférentes branchiales. Ces artères ont une structure semblable à celle retrouvée généralement chez tous les vertébrés et se divisent donc en trois couches : l'adventice, la media et l'intima (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

3. Veines

Les veines ont la capacité d'être davantage extensible que les artères et leur paroi est majoritairement composée de collagène. La majorité des veines ont un grand diamètre et le sang y circule à faible pression (Roberts, Ellis 2012).

4. Vaisseaux lymphatiques

Le système lymphatique est très développé chez le poisson et c'est en partie lié à forte perméabilité des vaisseaux capillaires (Roberts, Ellis 2012).

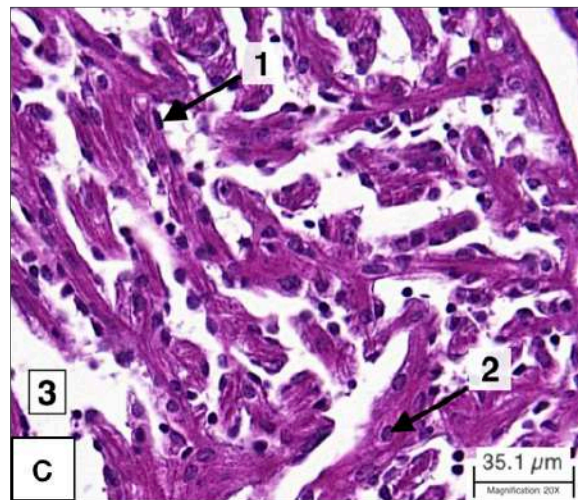
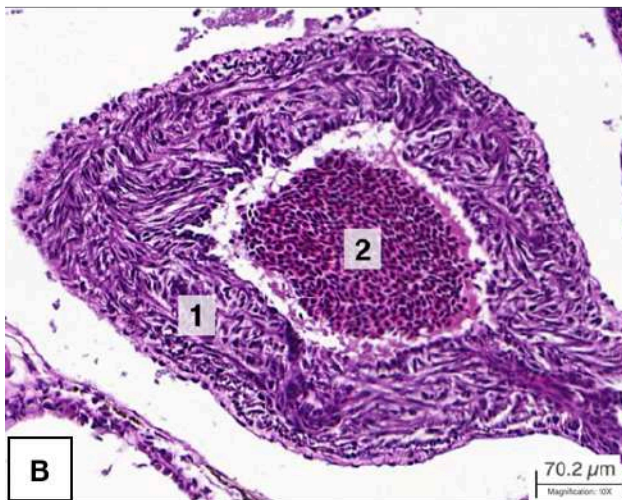
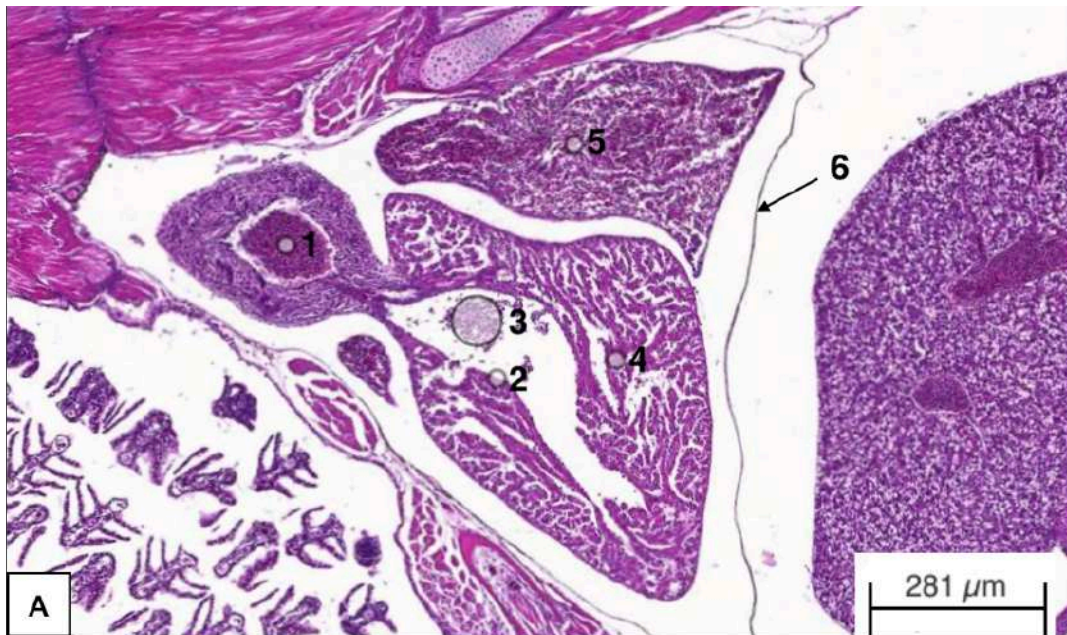


Illustration 3 : Cœur de N. furzeri en coupe longitudinale, femelle de 1 mois, observé au microscope optique (HE).

A : vue générale du cœur : (1) bulbe artériel, (2) endocarpe, (3) globules rouges, (4) ventricule et ses trabécules, (5) atrium, (6) péritoine.

B : Vue rapprochée du bulbe aortique : (1) muscles lisses et fibres élastiques reliées par un tissu conjonctif, (2) amas de globules rouges

C : Vue rapprochée des trabécules du ventricule : (1) noyau d'une cellule de l'endocarpe, (2) noyau central d'un cardiomyocyte, (3) lacune

D. Système respiratoire

Les branchies constituent un organe dont la surface, extrêmement développée, dépasse celle de la peau. Elles correspondent à des expansions tissulaires externes du tégument très fines, sièges privilégiés des échanges gazeux.

Elles sont situées de part et d'autre du pharynx, dans les chambres branchiales, protégées par les opercules (Roberts 2012).

1. Arc branchial

Les branchies sont portées par les arcs branchiaux, soutenus par du cartilage et recouverts par un épithélium en continuité avec celui du pharynx.

Les arcs branchiaux portent les lamelles primaires, ou lames branchiales, qui abritent une double vascularisation (Figure 17).

2. Filaments branchiaux (lamelles secondaires ou branchiales)

Les lamelles branchiales constituent la surface d'échange vascularisée. Elles sont essentiellement composées d'une enveloppe de cellules épithéliales qui sont soutenues et séparées par des cellules piliers. Cette structure renferme des capillaires sanguins séparés du milieu extérieur par une simple couche de cellules épithéliales. Cela permet de favoriser les échanges conjointement au fait que le flux d'eau s'écoule dans le sens inverse de celui de la circulation sanguine dans les capillaires.

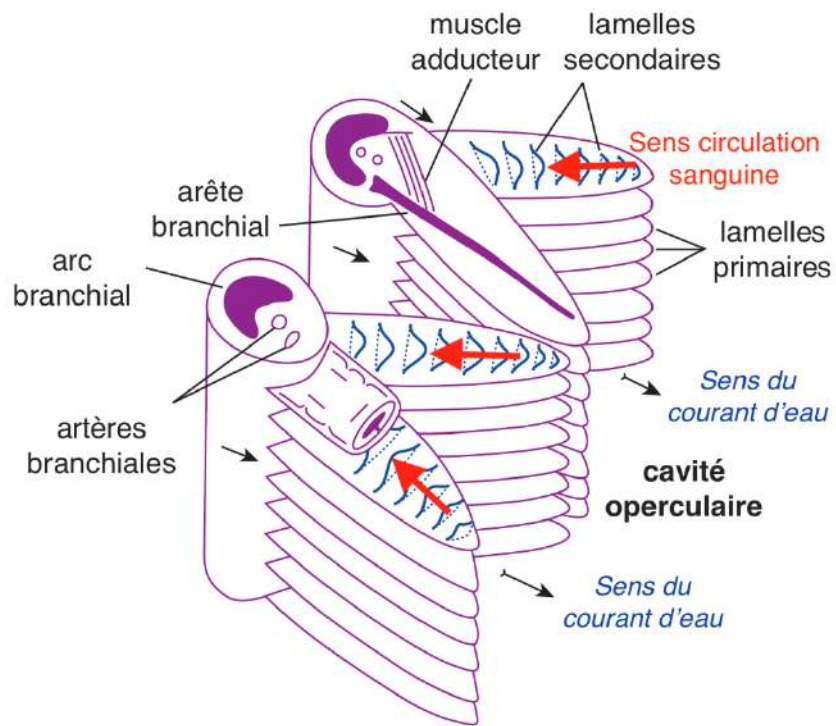


Figure 17 : Représentation schématique de deux segments d'arcs branchiaux adjacents (Roberts, Ellis 2012).

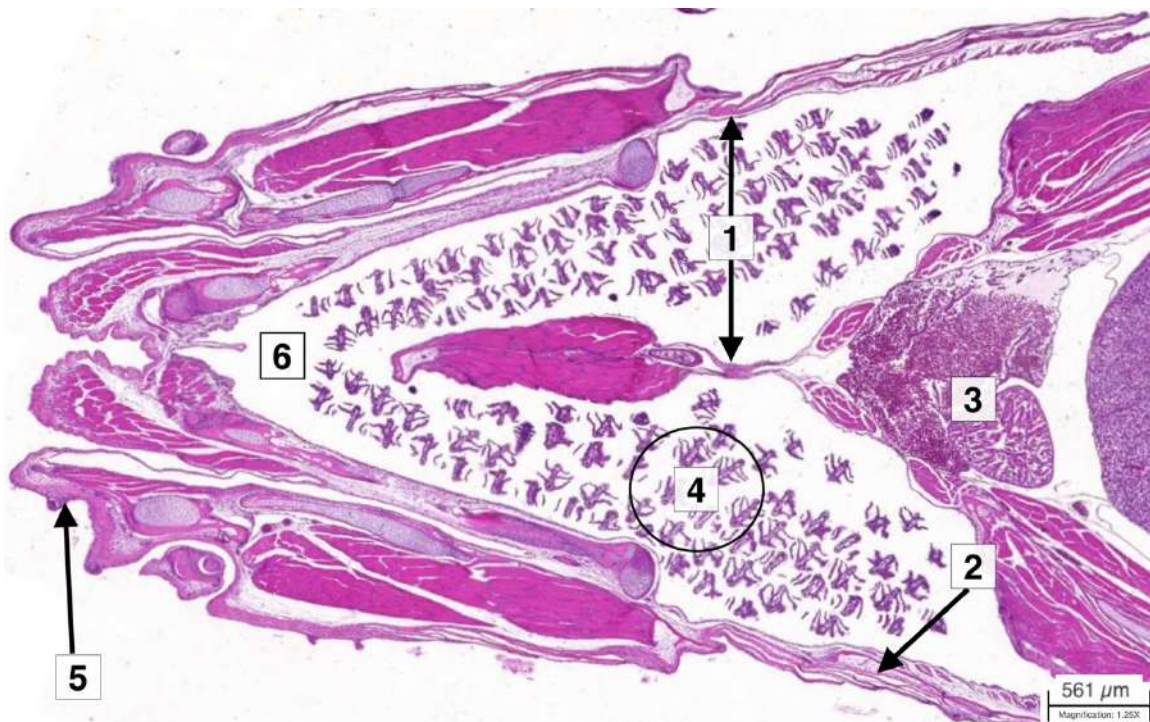


Illustration 4 : Histologie topographique des cavités branchiales de N. furzeri, mâle de 1 mois, en coupe longitudinale (HE). (1) cavité branchiale (ou operculaire), (2) opercule, (3) cœur, (4) branchies, (5) lèvres, (6) lacune

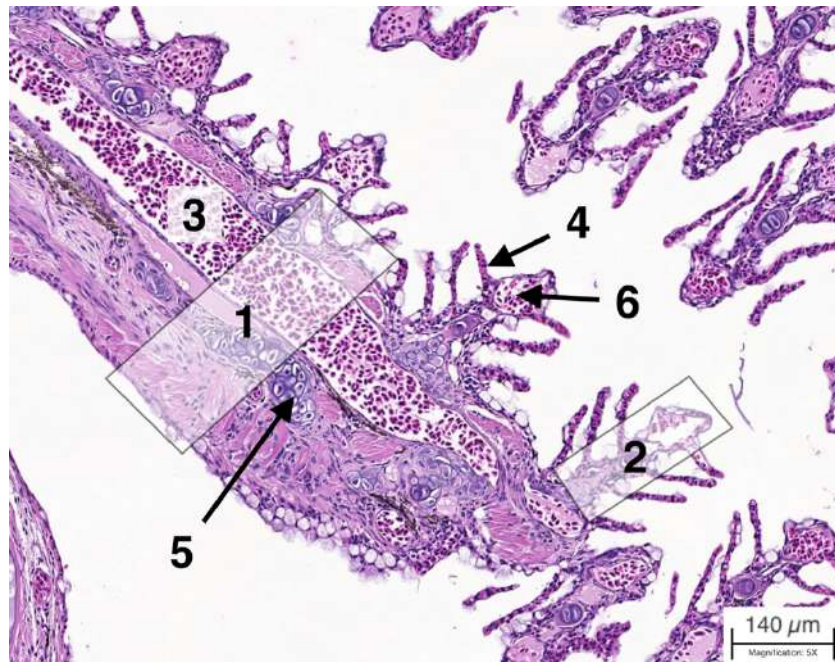


Illustration 5 : Coupe longitudinale d'un arc branchial de *N. furzeri* femelle de 7 mois (HE).
 (1) arc branchial, (2) lame branchiale (ou primaire), (3) artère, (4) lamelle branchiale (ou
 secondaire), (5) pseudocartilage, (6) capillaire

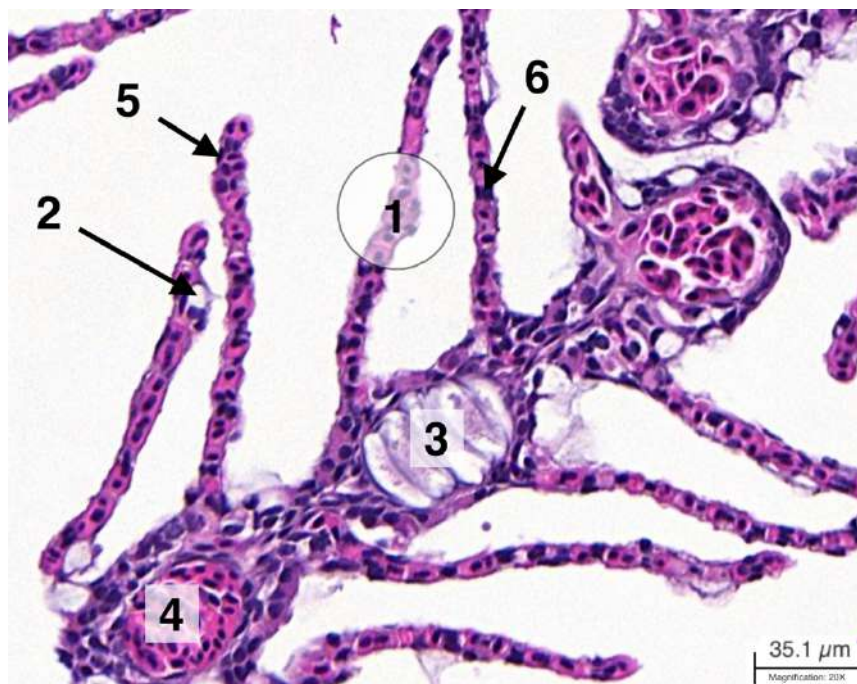


Illustration 6 : Lame branchiale de *N. furzeri* femelle de 7 mois en coupe longitudinale à fort
 grossissement (HE). (1) lamelle branchiale, (2) lacune de capillaire, (3) cartilage de soutien,
 (4) capillaire, (5) cellule épithéliale, (6) cellule pilier

3. Pseudobranchies

Les pseudobranchies ne sont pas présentes chez tous les poissons téléostéens mais *N. furzeri* en possède une paire. Ces organes dérivent du premier arc branchial et sont situés sur la face interne crânio dorsale la cavité branchiale. Elles sont formées par un réseau de capillaires organisés en parallèle portés par un arc cartilagineux. Les pseudobranchies sont en connexion directe avec le corps choroïdien de l'œil qui est lui-même composé d'un réseau similaire de capillaires. (Elles ne jouent donc aucun rôle dans la fonction de respiration mais peuvent être présentées conjointement aux organes respiratoires du fait de son lien anatomique avec les branchies).

Les pseudobranchies n'ont pas de fonction dans les échanges gazeux. Elles sont considérées comme ayant une fonction endocrine et comme jouant un rôle dans le transport et la régulation de l'oxygène sanguin vers les yeux.

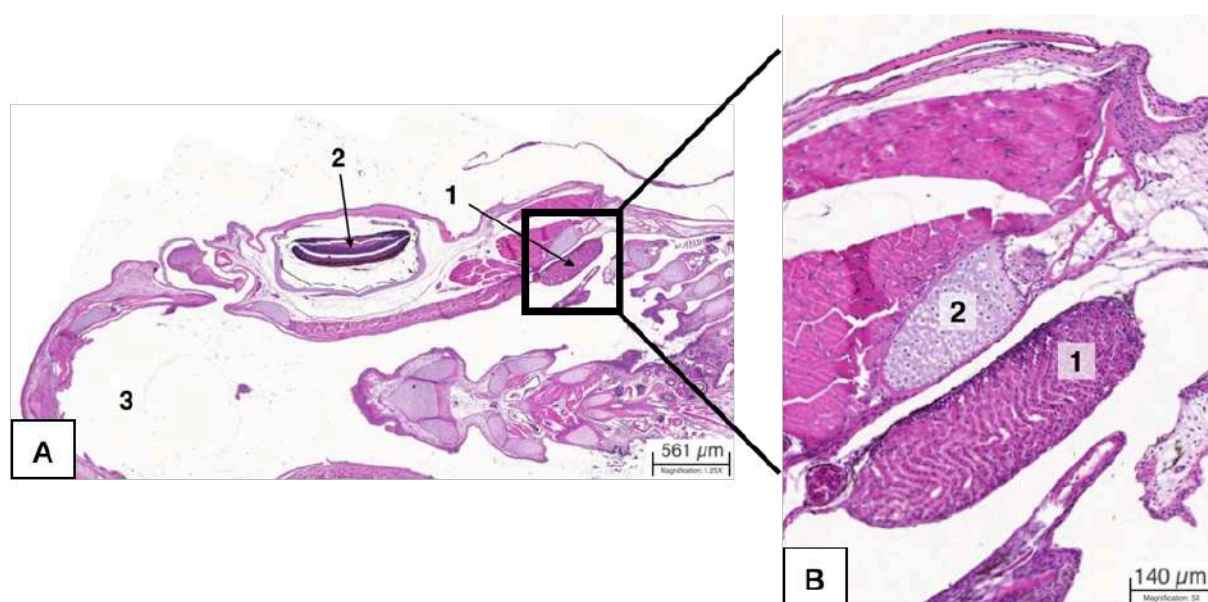


Illustration 7 : Coupe longitudinale de pseudobranchie de *N. furzeri* mâle de 1 mois, à faible grossissement (A) et à fort grossissement (B) (HE). (1) pseudobranchie, (2) œil, (3) bouche.

E. Système digestif

1. Tube digestif

Le tractus digestif des *Nothobranchius* a été décrit selon Wilson et Castro (2010), comme étant constitué de 4 segments.

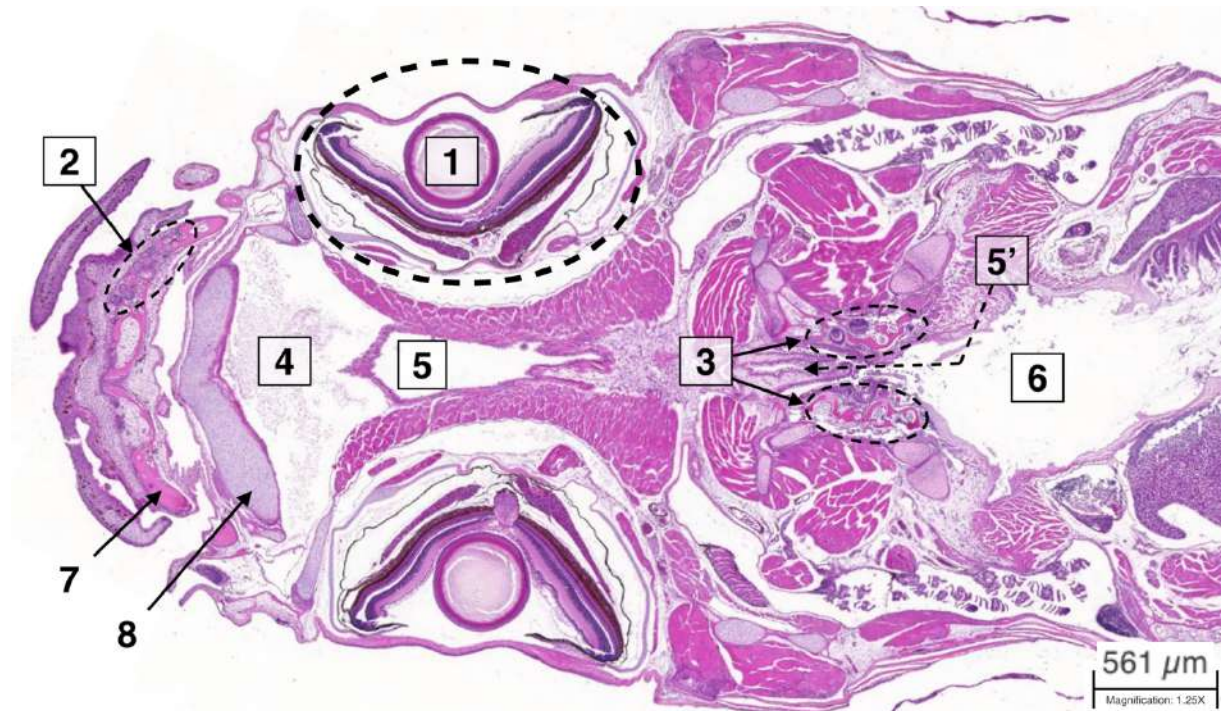


Illustration 8 : Histologie topographique des segments proximaux du tube digestif chez de N. furzeri mâle de 1 mois (HE). (1) œil, (2) dents buccales, (3) dents pharyngiennes, (4) bouche, (5) partie antérieure du pharynx, (5') partie postérieure du pharynx, (6) lumière de l'œsophage, (7) os de la mâchoire, (8) cartilage du crâne (chondrocranium)

Le premier, le **segment buccal**, inclue la bouche et le pharynx. Il s'agit du segment dans lequel débute l'alimentation. Il concerne donc la prise de nourriture et l'initiation des processus mécaniques nécessaires à la digestion. *N. furzeri* possède des dents buccales et pharyngiennes, comme de nombreux téléostéens. Elles sont homodontes, ne possèdent pas de racine et leur croissance est continue. Elles sont constituées par la dentine, secrétées par les odontoblastes, qui renferme la pulpe dentaire. Le pharynx est tapissé par un épithélium riche en cellules caliciformes (Dyková 2022). Les lèvres sont constituées d'un épithélium squameux stratifié non kératinisé.

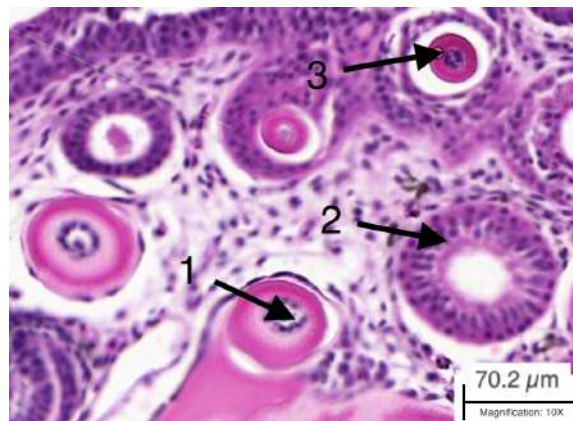


Illustration 9 : Coupe longitudinale de dents de *N. furzeri* (femelle de 5 mois) (HE). (1) pulpe dentaire, (2) odontoblastes, (3) dentine

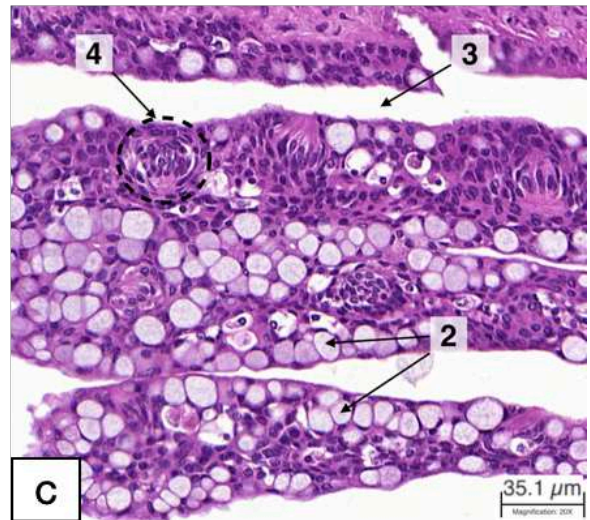
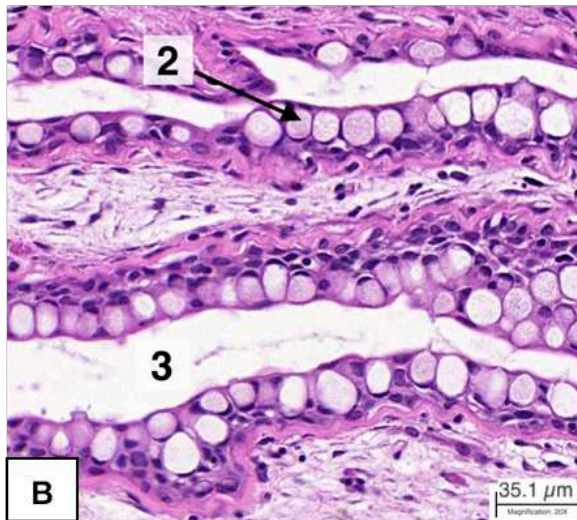
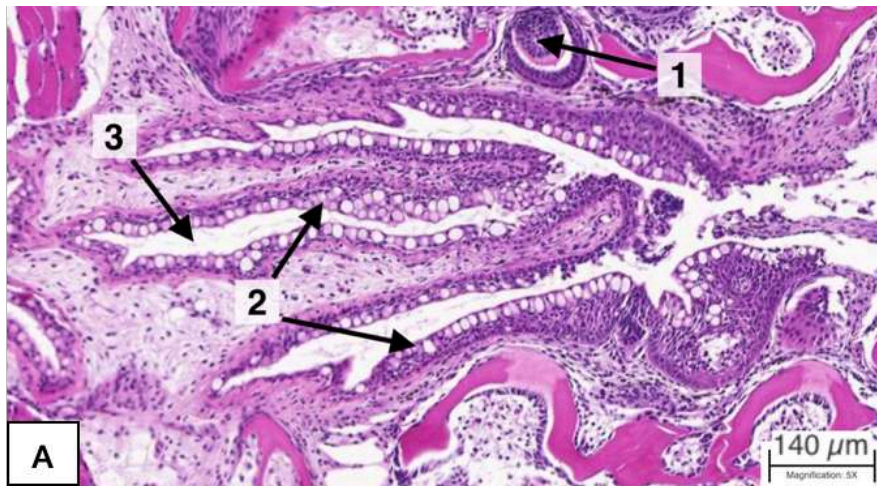


Illustration 10 : Coupe longitudinale du pharynx de *N. furzeri* (mâle de 1 mois) à moyen (A) et fort grossissement (B, C). (1) dent pharyngienne, (2) cellules muqueuses, (3) lumière, (4) bourgeon gustatif

Le second segment correspond la **portion proximale du tube digestif** et se résume à l'œsophage chez les Cyprinodontiformes qui sont agastriques (Wilson, Castro 2010). Chez *N. furzeri* et chez les téléostéens de manière générale, ce segment est très court.

Les troisième et quatrième segments sont les **intestins**, distingués chez *N. furzeri* en intestin proximal (ou moyen) et distal (ou postérieur), et le **rectum**.

Le tube digestif, de l'œsophage au rectum, présente une architecture remarquable par sa régularité. Sa principale caractéristique est de posséder 4 couches qui sont successivement, depuis la lumière intestinale (Genten, Terwinghe, Danguy 2010) :

- La **muqueuse** constituée d'un épithélium bordant la lumière de l'intestin, d'un chorion conjonctif (*lamina propria*) et d'une couche musculaire.
- La **sous-muqueuse**, formée d'un tissu conjonctif lâche, aglandulaire.
- La **musculeuse** divisée en deux couches, une circulaire interne et une longitudinale externe responsables du péristaltisme.
- La **séreuse**, couche la plus externe, faite de tissu conjonctif.

Il faut noter que chez *N. furzeri*, la distinction histologique entre la muqueuse et la sous-muqueuse n'est pas claire comme le montre l'image ci-après.

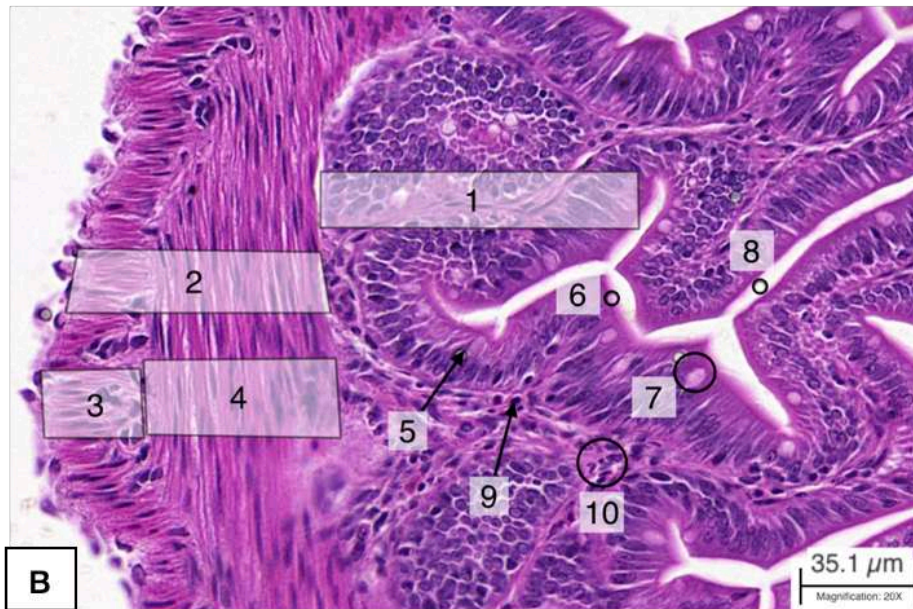
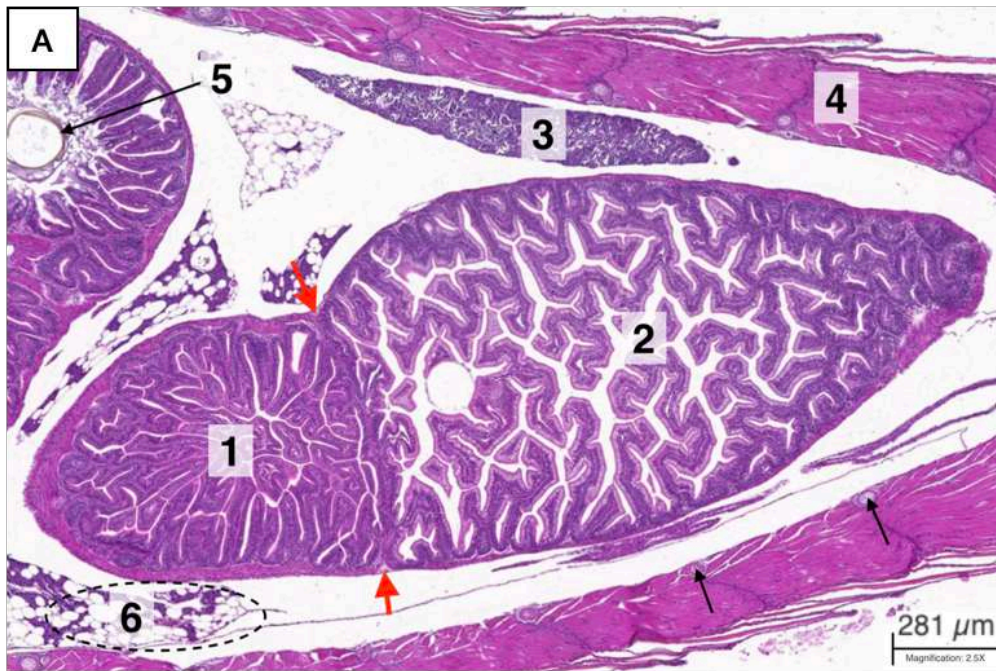


Illustration 11 : Coupe longitudinale de segment intestinal chez *N. furzeri* (mâle, 1 mois) (A) et de sa paroi (B) (HE).

A : (1) intestin, (2) gros intestin, (3) testicule, (4) paroi musculaire abdominale, (5) reste du bol alimentaire, (6) pancréas diffus, (→) côtes/arête, (→) limites entre l'intestin et le gros intestin

(B) : (1) muqueuse et sous-muqueuse, (2) musculieuse, (3) couche externe longitudinale, (4) couche interne circulaire, (5) entérocyte, (6) bordure en brosses = microvillosités, (7) cellule caliciforme, (8) lumière intestinale, (9) lymphocyte, (10) lamina propria

2. Foie

Les glandes digestives que sont le foie et le pancréas sont indispensables pour ces poissons agastriques (Dyková 2022).

Le foie est un organe d'origine mésodermique de grande taille chez *N.furzeri* situé dans l'abdomen crânial. Il est entouré d'une capsule et occupe toujours largement la cavité abdominale (Genten, Terwinghe, Danguy 2010)

Le parenchyme hépatique chez *N. furzeri* est relativement homogène. Il est majoritairement formé par les hépatocytes, des cellules de forme polygonale dont la composition cytoplasmique est plus ou moins riche en lipides ou glycogène. Ces hépatocytes ne s'organisent pas en lobules ou en travées hépatocytaires comme ce peut être décrit chez d'autres vertébrés (Evensen 2006).

Les hépatocytes élaborent la bile qui est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire. Cet organe est bordé par un épithélium prismatique simple. Le contenu est déversé, selon les besoins dans la portion crâniale du tube digestif via le canal cholédoque suite à la contraction de muscles lisses qui composent sa paroi (Genten, Terwinghe, Danguy 2010). Comme chez les mammifères, la bile est composée de pigments (biliverdine et bilirubine), de sels biliaires, de cholestérol, de lipides, d'électrolytes et d'eau.

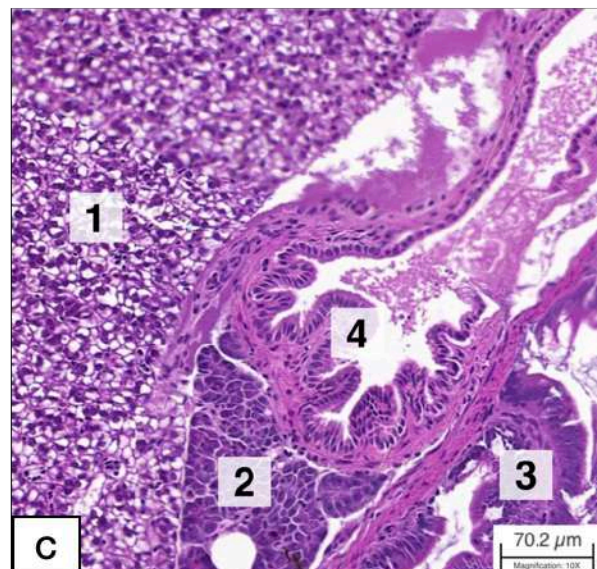
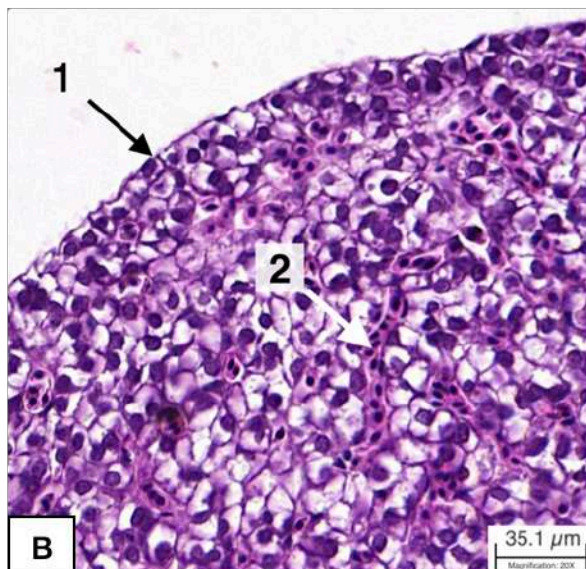
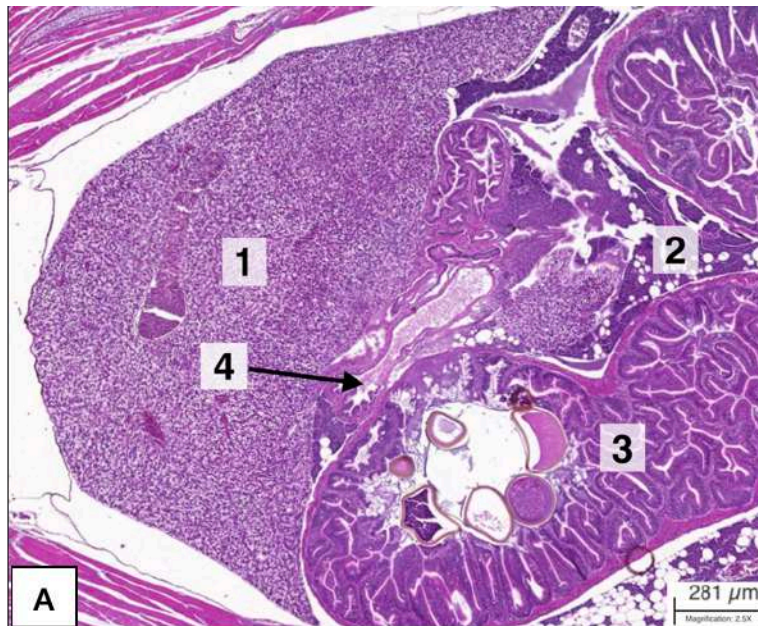


Illustration 12 : Coupe longitudinale du foie et de la vésicule biliaire de *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE).

A : Vue à faible grossissement. (1) foie, (2) pancréas diffus, (3) intestin, (4) vésicule biliaire
B : Vue à fort grossissement du parenchyme hépatique. (1) capsule de Glisson, (2) sinusoiide remplie de globules rouges

C : Vue rapprochée de la vésicule biliaire. (1) foie, (2) pancréas diffus, (3) intestin, (4) vésicule biliaire

3. Pancréas

Le pancréas de *N. furzeri* est similaire à celui des poissons téléostéens de manière générale. Ce n'est pas un organe congloméré mais se compose d'agrégats de pancréas exocrine et endocrine répartis de manière diffuse dans l'abdomen. Il est surtout porté par la graisse mésentérique mais se retrouve également au contact d'autres organes, en particulier le tube digestif, le foie, et la vésicule biliaire (Caruso, Sheridan 2011).

Le pancréas exocrine se présente sous la forme d'un tissu glandulaire majoritairement extra-hépatique bien que quelques acini puissent être retrouvés au sein du parenchyme hépatique. Il est constitué par des amas de cellules pyramidales disposés en cordons ou parfois en acini séreux comme chez les mammifères. Leur cytoplasme est rempli de grains de zymogène (Dyková 2022).

Le pancréas endocrine prend la forme d'un amas compact de cellules encapsulé présentant la même fonction que les îlots de Langerhans chez le mammifère. Il s'agit des corps de Brockmann, qui par abus de langage et similitude de fonction sont aussi appelés îlots de Langerhans dans la littérature. Il se répartit exclusivement dans le secteur extra-hépatique (Dyková 2022). Les téléostéens possèdent généralement un ou deux îlots principaux, pouvant atteindre de très grande taille, accompagnés ou non d'îlots plus petits, satellites. Il produit différentes hormones qui sont d'abord relarguées dans le fluide extracellulaire puis rejoignent la circulation sanguine en entrant dans les capillaires. Les corps de Brockmann sont richement vascularisés. Ces hormones sont comme chez les mammifères le glucagon (production par les cellules α), l'insuline (production par les cellules β), la somatostatine (production par les cellules δ) mais également le peptide YY (production par les cellules F) (Caruso, Sheridan 2011).

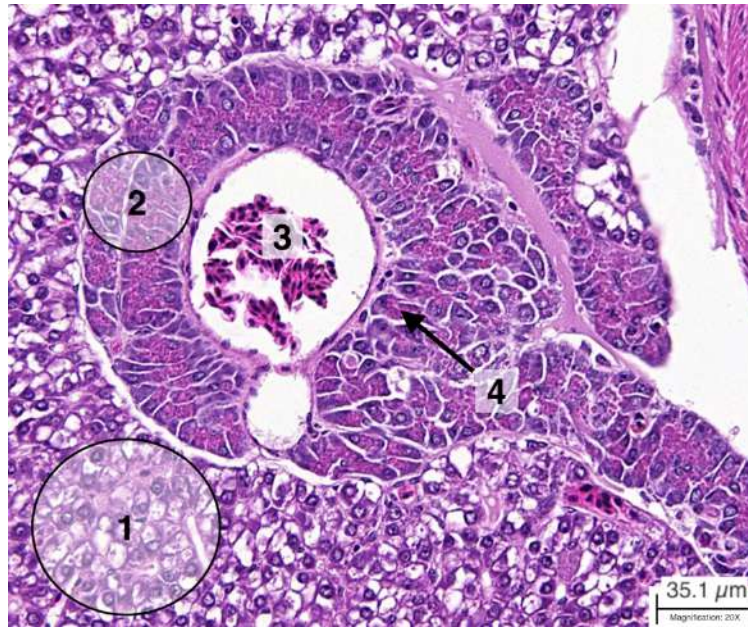


Illustration 13 : Vue rapprochée d'un amas de cellules pancréatiques exocrines intra-hépatique, femelle de 7 mois (HE). (1) parenchyme hépatique, (2) cellules pancréatiques exocrines, (3) vaisseau sanguin rempli de globules rouges, (4) grains de zymogène

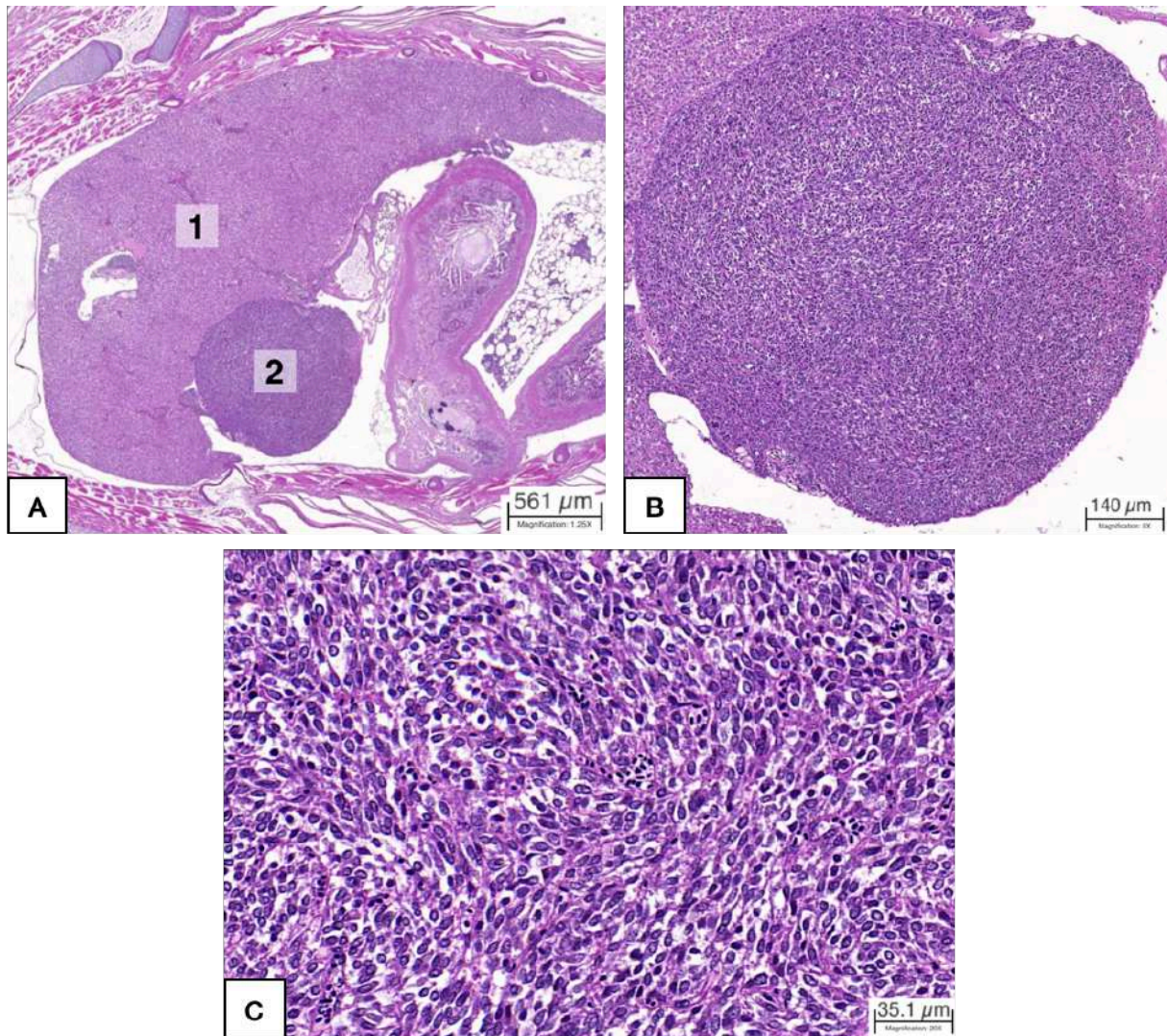


Illustration 14 : Histologie topographique des ilots de Langerhans chez N. furzeri mâle de 7 mois (A). Corps de Brockmann (ou ilot de Langerhans) en vue générale (B), rapprochée centrée sur le parenchyme (C) (HE). (1) foie, (2) îlot de cellules pancréatiques endocrines.

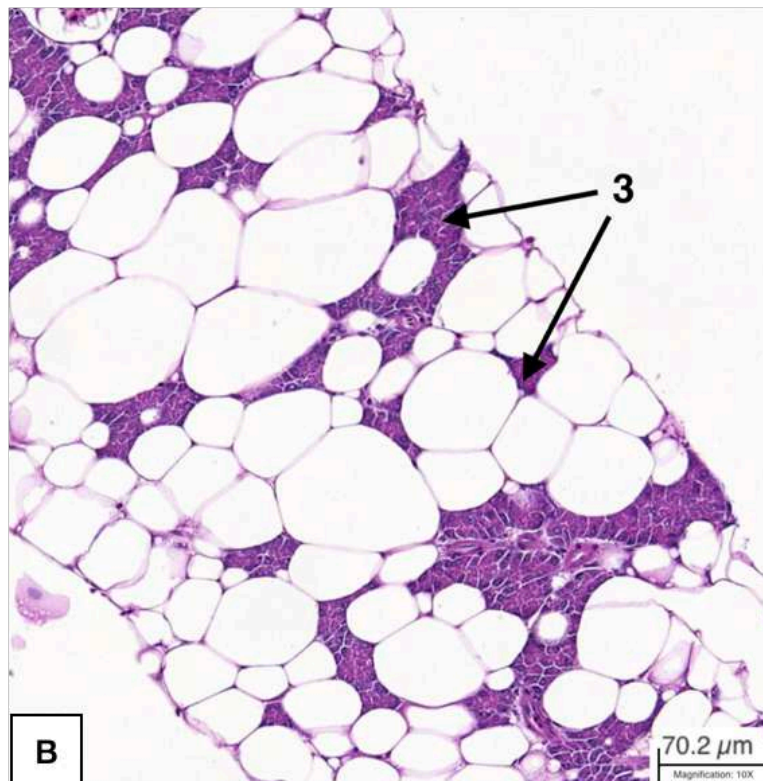
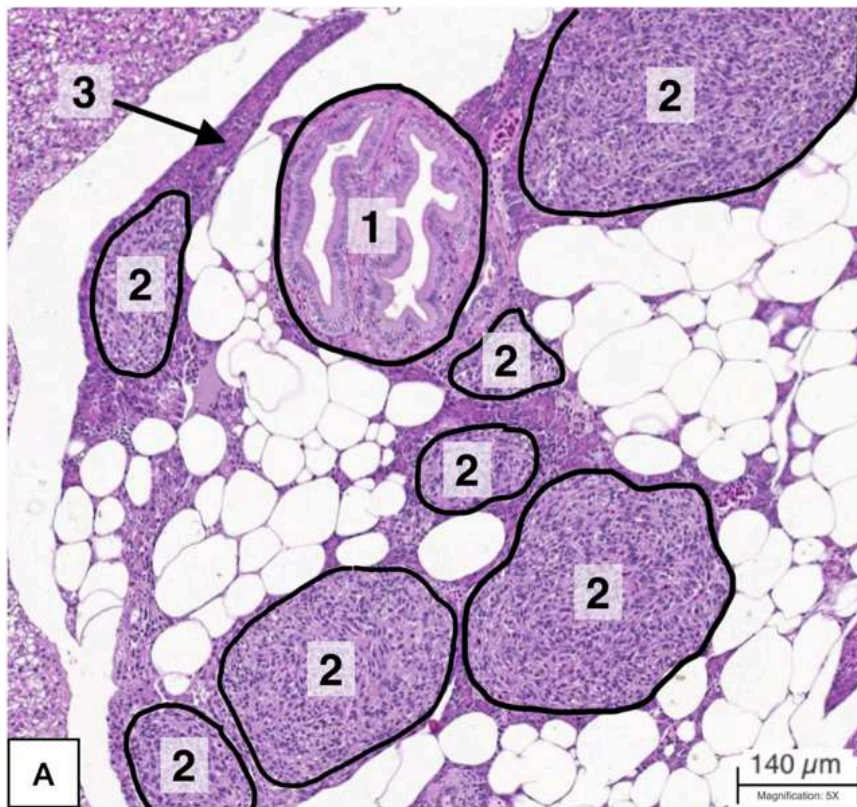


Illustration 15 : Multiples ilots de pancréas endocrine et pancréas exocrine diffus chez *N. furzeri* mâle de 5 mois (A) et vue rapprochée du pancréas exocrine au sein du tissu adipeux (B) (HE). (1) canaux biliaires, (2) corps de Brockmann, (3) ilots disséminés de pancréas exocrine

F. Système hémato-lymphoïde

1. Tissu hématopoïétique rénal

Les poissons ne possèdent pas de moelle osseuse, leur tissu hématopoïétique est donc davantage développé dans les reins et la rate (Ellis 1982). Le rein est d'ailleurs le siège principal de l'activité hématopoïétique chez le poisson. Ce tissu constitue également la matrice pour les néphrons. Le tissu hématopoïétique se répartit plus largement sur la partie crâniale des reins (Mumford et al. 2007) et prend l'aspect d'amas cellulaires compacts.

Cette portion du rein est pourvue de nombreux capillaires sanguins discontinus. On trouve donc des globules rouges dans le stroma. Le tissu hématopoïétique rénal comporte également des centres mélanomacrophages (CMM). Les CMM sont des agrégats de macrophages pigmentés retrouvés majoritairement dans le rein et la rate (Steinel, Bolnick 2017). Ces cellules immunitaires phagocytaires sont caractéristiques des Téléostéens. Leur reconnaissance est plus aisée au microscope photonique, leur couleur varie du jaune pâle au noir. Le nombre, la taille et le contenu en mélanine peuvent a priori varier selon le sexe, l'âge et les conditions de vie défavorables (*stress chronique, maladies, ...*). Ces CMM seraient plus nombreux chez les poissons plus âgés mais ce phénomène n'est pas encore clairement établi suite à nos observations (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

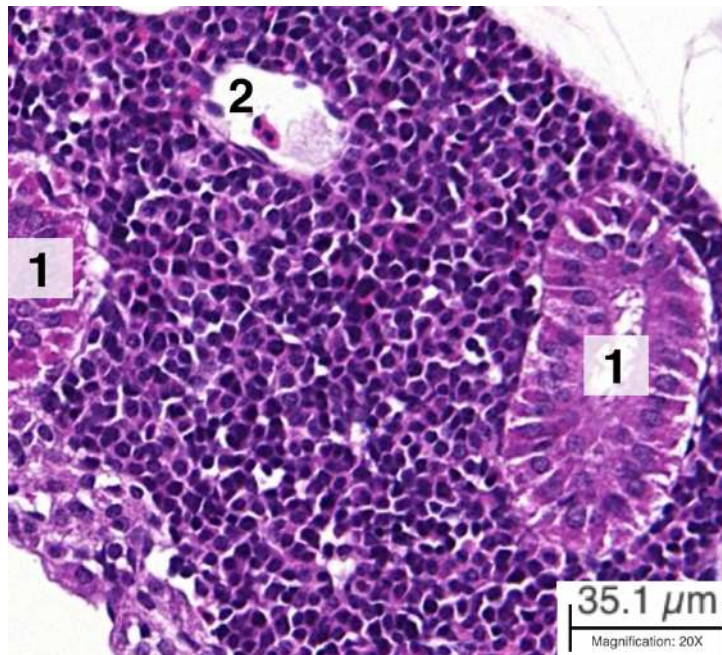


Illustration 16 : Vue à fort grossissement du tissu hématopoïétique du rein de N. furzeri mâle de 3 mois en coupe longitudinale (HE). (1) tube contourné proximal, (2) capillaire avec deux globules rouges

2. Rate

Comme chez la majorité des poissons téléostéens, la rate du *Nothobranchius* est un organe hématopoïétique accessoire et sa structure diffère de celle observée chez les mammifères. Elle est en partie responsable de la filtration sanguine, est un site de destruction cellulaire et de stockage des érythrocytes. La pulpe blanche et rouge sont diffuses et non distinctement délimitées comme c'est le cas chez la plupart des mammifères (Dyková 2022). La rate forme une masse unique suspendue dans la cavité péritonéale et située à proximité du tube digestif. Elle est recouverte d'une fine capsule conjonctive (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

La pulpe rouge constitue l'essentiel du parenchyme splénique et se compose de sinusoides remplis de globules rouges, de thrombocytes, de macrophages, de lymphocytes ainsi que de cellules de type fibroblastique. Elle assure des fonctions phagocytaires, érythropoïétiques et lymphopoïétiques (Genten et al. 2010).

La pulpe blanche est formée majoritairement des lymphocytes et de quelques granulocytes. C'est aussi l'un des sites préférentiels des centres mélanomacrophages (Fänge, Nilsson 1985).

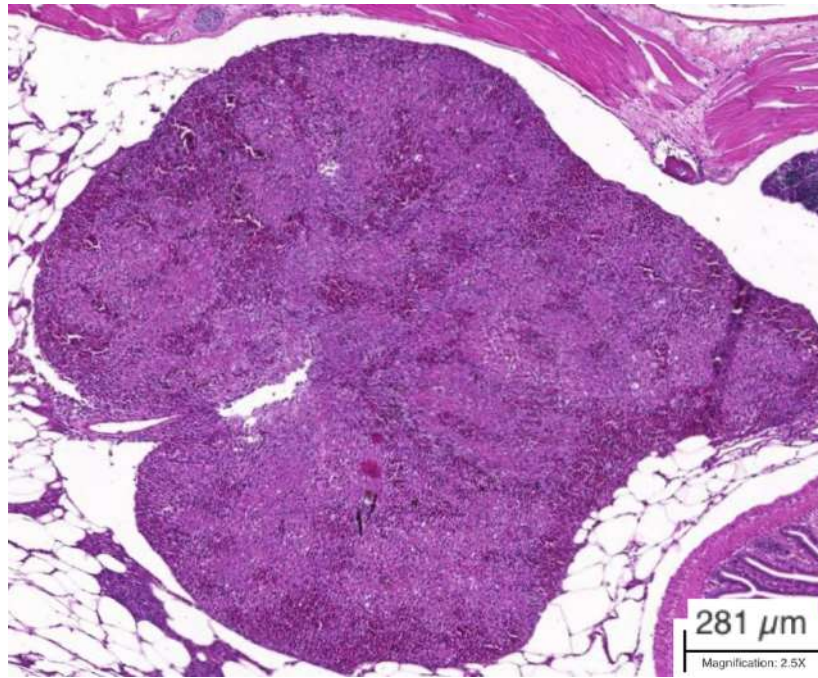


Illustration 17 : Vue générale de la rate de N. furzeri, mâle de 1 mois, en coupe longitudinale (HE)

3. Thymus

Le thymus est un organe pair et se présente sous la forme d'un amas ovoïde de tissu lymphoïde situé en région sous-cutanée dans la commissure dorsale de l'opercule. Cet organe involue chez certains téléostéens primitifs après la maturation sexuelle mais se maintient et parfois même évolue chez d'autres. Vu en coupe, il se compose d'un ensemble de lymphocytes entourés par une capsule fibreuse. Certains poissons possèdent un thymus riche en macrophages (Roberts, Ellis 2012).

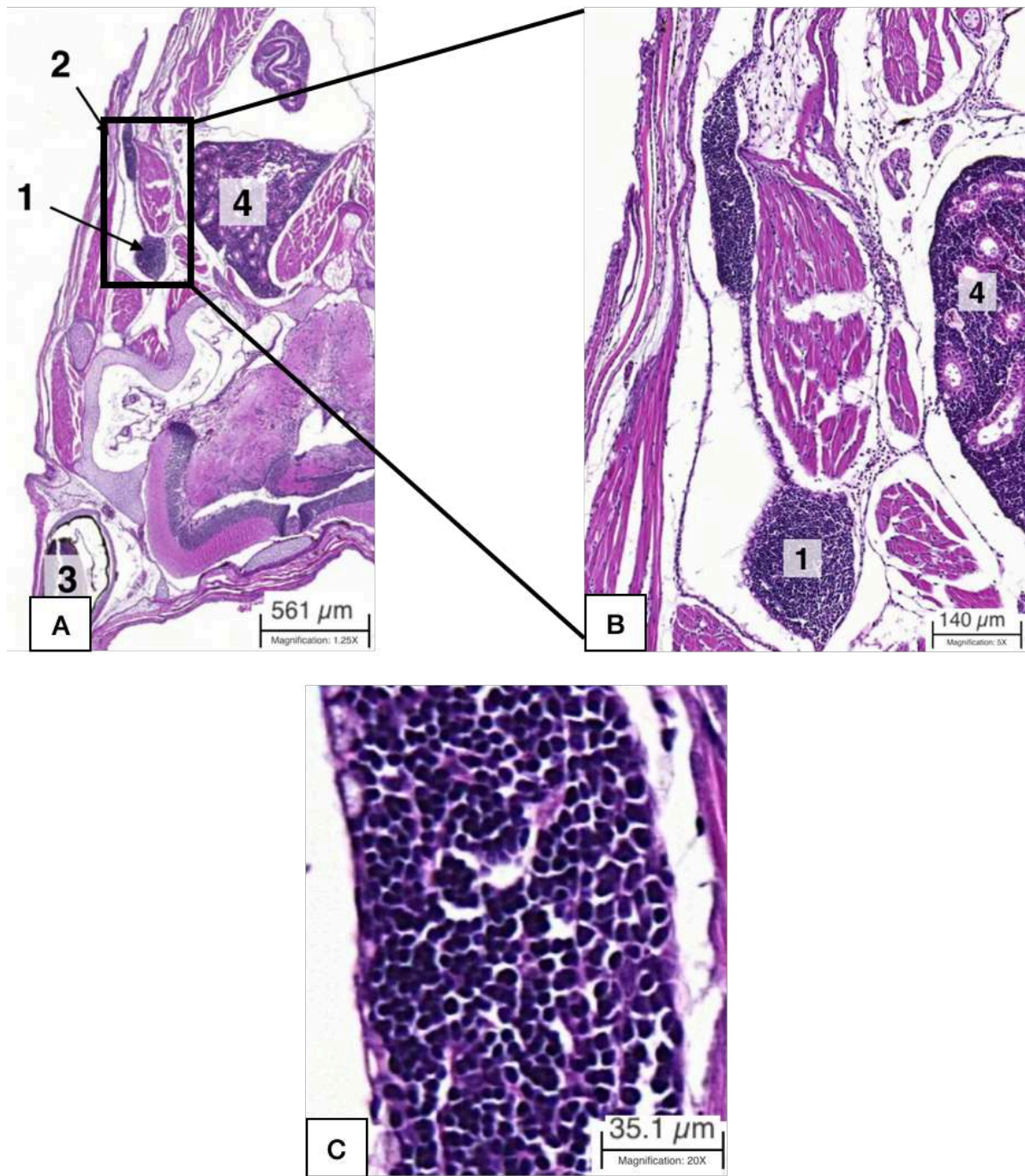


Illustration 18 : Vue depuis la topographie générale (A) et vue rapprochée (B) du thymus de N. furzeri femelle de 7 mois en coupe longitudinale (HE). (1) thymus, (2) opercule, (3) œil, (4) rein

G. Système reproducteur

1. Gonades mâles

Les gonades mâles sont représentées par une paire de testicules. Ce sont des organes allongés, qui accolent dorsalement la vessie natatoire dans la cavité abdominale. Ils sont prolongés caudalement par un canal déférent qui s'abouche au niveau de la papille génitale.

Les testicules de *N. furzeri* sont organisés en deux parties. L'une périphérique, est formé par de nombreux lobules renfermant les différentes cellules rencontrées lors de la spermatogénèse, des spermatogonies aux spermatozoïdes en passant par différents stades de spermatocytes et les spermatides. Leur centre est formé par des tubules dans lesquels on retrouve les spermatides et les spermatozoïdes matures. Ces derniers sont acheminés par les canaux efférents du testicule se prolongeant par des spermiductes qui fusionnent dans leur partie distale et débouchent par un orifice strictement génital se situant entre l'anus et l'orifice urinaire (Dyková 2022).

Ces structures sont soutenues par un important tissu conjonctif interstitiel (Genten, Terwinghe, Danguy 2010)

Les observations chez des poissons d'âge différents tendent à montrer que les testicules deviennent plus volumineux avec l'âge. Les individus âgés conservent effectivement des gonades sexuels fonctionnels car des spermatozoïdes matures sont observables dans les tubules.

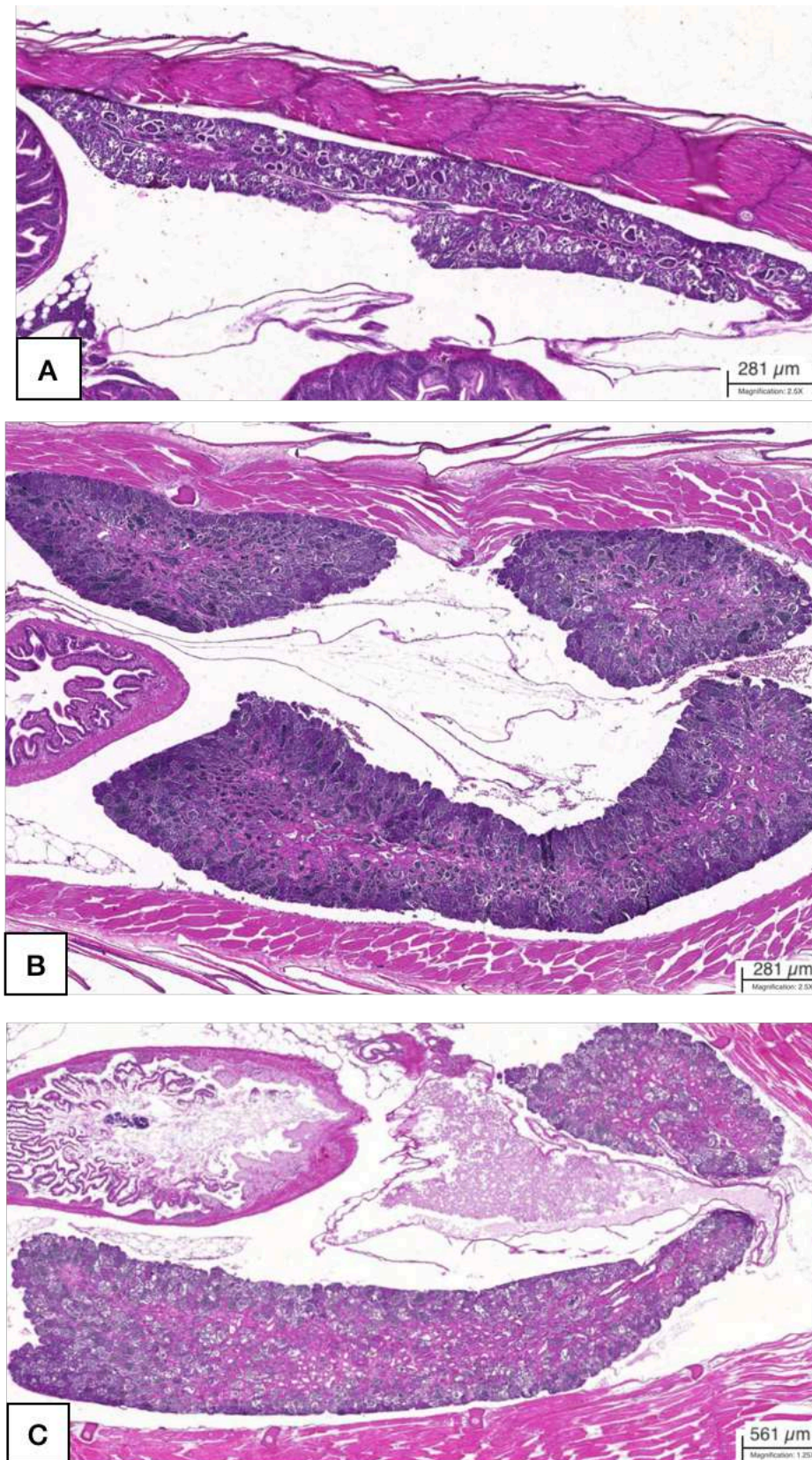


Illustration 19 : Vue générale des gonades mâles, testicules, de *N. furzeri* en coupe longitudinale chez un mâle de 1 mois (A), de 3 mois (B) et de 6 mois (C) (HE).



Illustration 20 : Vue rapprochée de la structure des testicules de *N. furzeri* montrant les lobules et tubules séminifères, mâle de 1 mois (HE). (1) tissu conjonctif interstitiel, (2) spermatozoïdes matures, (3) spermatides, (4) spermatocytes, (5) spermatogonies

2. Gonades femelles

Les ovaires de *N. furzeri* forment une grappe de follicules ovariens à différents stades de maturation. La différence entre les stades se résume principalement par leur taille : les follicules sont de plus en plus gros et se gorgent de cellules vitellines au cours de la maturation. Il s'agit d'un poisson ovipare donc les ovaires n'ont pas de rôle abritant ou nourrissant comme chez les ovovivipares ou les vivipares.

Un caractère récurrent chez les poissons téléostéens, y compris chez le *Nothobranchius* semble être la présence d'ovaires creux. Ces cavités ovariennes serviraient de passage aux ovules mûres (Genten, Terwinghe, Danguy 2010). La croissance ovocytaire peut être décomposée schématiquement en 3 phases :

- La prévitellogénèse qui correspond aux premiers stades de développement des cellules germinales. Elle comprend les ovogonies et les très jeunes ovocytes qui ont un noyau large sphérique et un cytoplasme faiblement basophile, d'aspect homogène.
- La vitellogénèse, au cours de laquelle l'ovocyte grossit et la basophilie de l'ooplasme s'accroît au début avant de décroître. Les nucléoles deviennent plus nombreux et migrent en périphérie rendant alors le cytoplasme hétérogène. Il y a progressivement l'apparition de granules de vitellus.
- La phase de maturation des ovocytes

L'observation histologique montre généralement des œufs à différentes étapes de leur développement. Un follicule correspond à l'ovocyte entouré d'une zone acellulaire faite de protéines fibreuses et de glycosaminoglycane, l'enveloppe vitelline ou *zona radiata*. Elle est bordée par des cellules épithéliales dites folliculaires formant la *zona granulosa* et assurant la nutrition de l'ovocyte. Les thèques internes et externes se situent en périphérie.

Des différences histologiques majeures sont constatées chez les femelles d'âge différent. Naturellement, le nombre de follicules atreétiques augmente chez les femelles âgées, comme la taille de la lacune retrouvée au centre de l'ovaire. Le nombre d'ovocytes en phase prévitellogénétique semble augmenter jusqu'à un certain âge puis décroître.

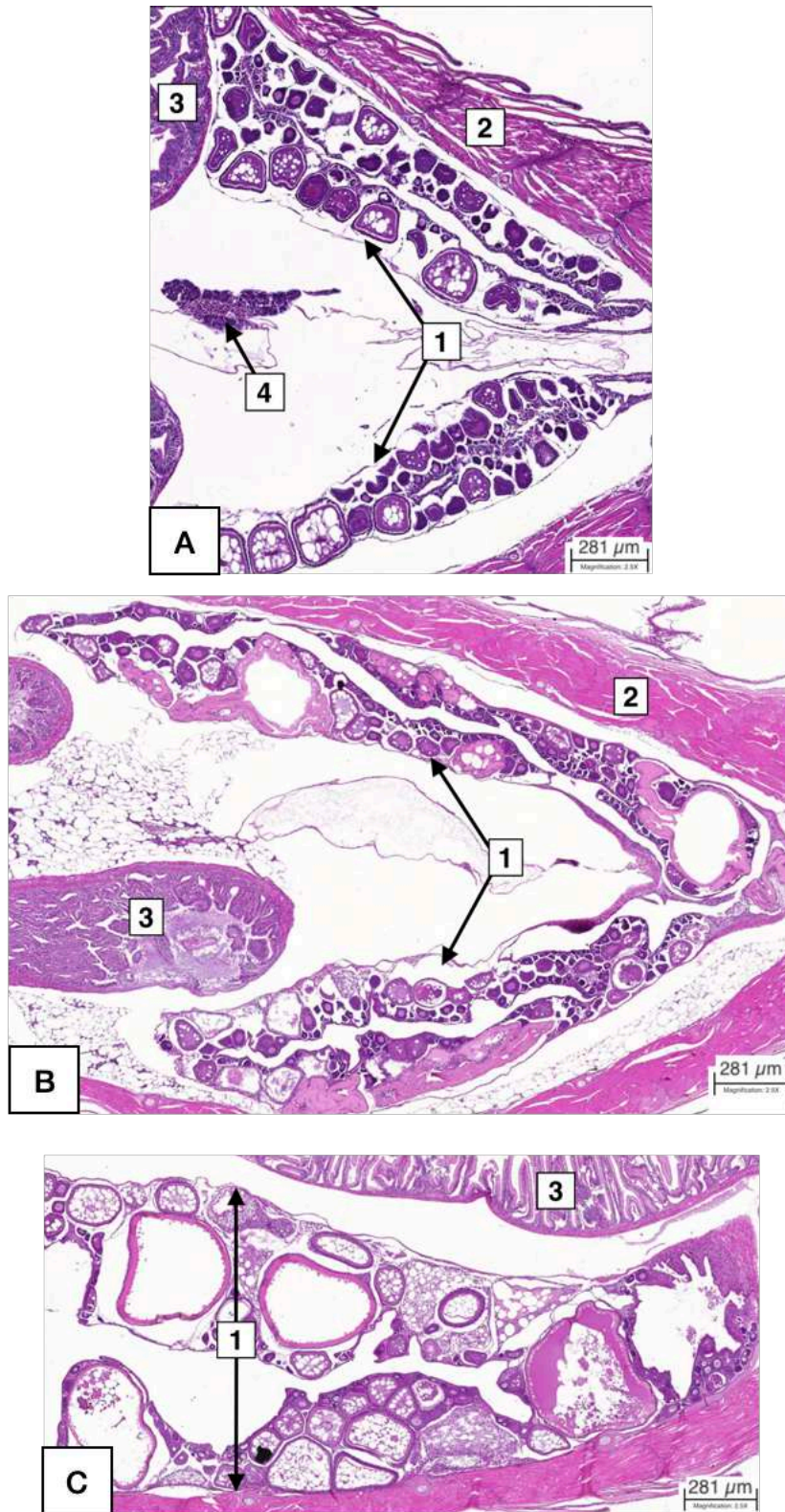


Illustration 21 : Vue générale des gonades femelles, ovaires de *N. furzeri* en coupe longitudinale chez une femelle de 1 mois (A), 4 mois (B) et 7 mois (C) (HE). (1) ovaires, (2) paroi musculaire abdominale, (3) intestin, (4) pancréas

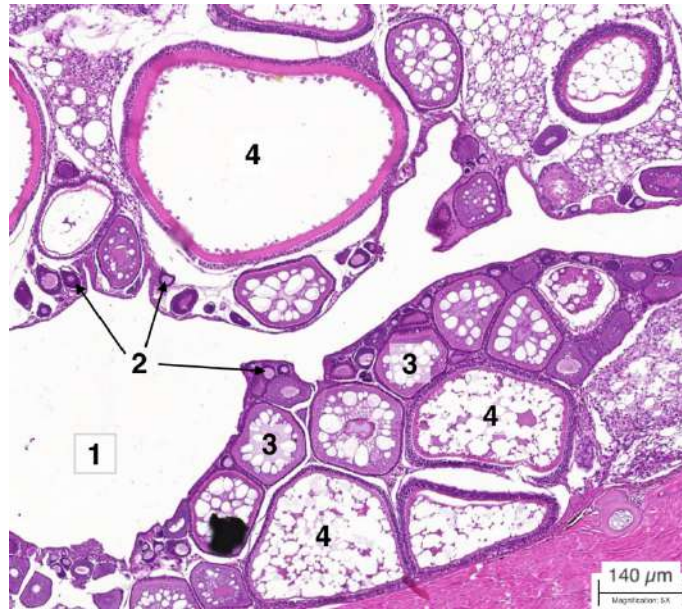


Illustration 22 : Vue rapprochée de l'ovaire de N. furzeri de 7 mois (HE).

(1) cavité ovarienne, (2) ovocytes prévitellogéniques, (3) ovocytes vitellogéniques en phase précoce, (4) ovocytes vitellogéniques en phase tardive

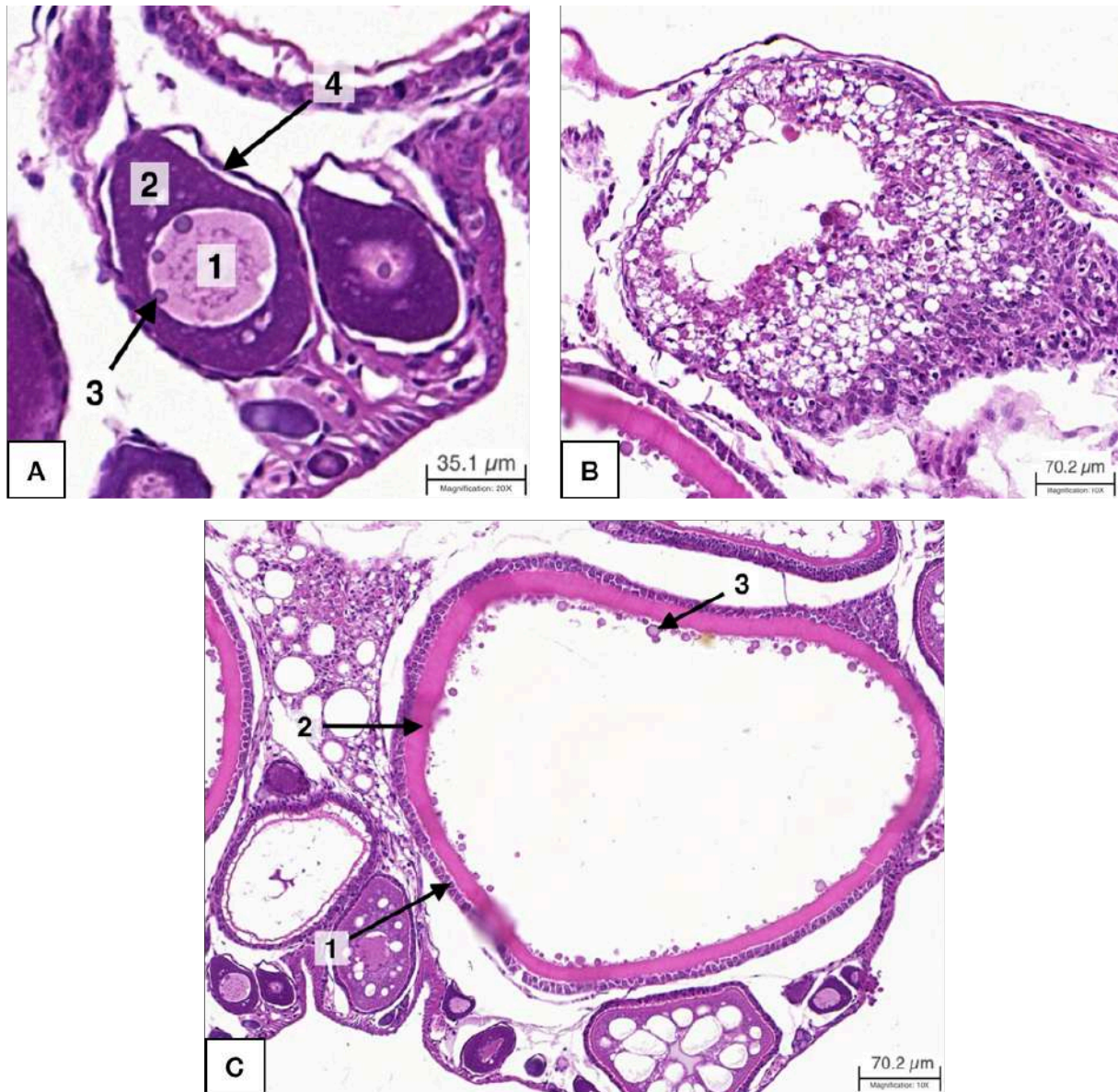


Illustration 23 : Stades de développement de l'ovocyte chez une femelle de 7 mois (HE).

A : Ovocyte vitellogénique en phase précoce. (1) noyau, (2) cytoplasme, (3) nucléole, (4) cellule folliculaire. **B : Ovocyte atrétique.** **C : Ovocyte vitellogénique en phase tardive.** (1) cellules folliculaires, (2) zona radiata = enveloppe vitelline, (3) granules vitellins.

H. Système urinaire

1. Reins

Les reins sont, chez *N. furzeri*, pairs, symétriques, de forme arrondie dite « en haricot » dans leur portion crâniale et poursuivis caudalement par deux longs canaux urinaires. Ils sont situés en région rétropéritonéale, donc dorsalement dans la cavité abdominale et de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils s'étendent sur toute la longueur de la cavité abdominale et se rejoignent caudalement au niveau de la nageoire anale pour s'aboucher en arrière de l'anus et des voies génitales.

Les reins sont d'origine mésodermique et au-delà de leur fonction émonctoïre, le rein comportent également un tissu hématopoïétique.

La partie assurant la fonction émonctoïre est constituée de néphrons incluant des glomérules et un système de tubules supporté par un tissu conjonctif et hématopoïétique.

2. Glomérules

La majorité des poissons, y compris *N. furzeri*, possède des glomérules. Il s'agit d'un réseau de capillaires contenu dans la capsule de Bowman dont le rôle est la réalisation de l'ultrafiltration (Perry 2011). Comme chez les autres poissons téléostéens, le glomérule est recouvert par des membranes pariétale et viscérale délimitant la capsule de Bowman. Ces membranes sont caractérisées par des fenestrations facilitant le passage et donc la filtration du plasma (Figure 18). On peut reconnaître en son sein des cellules également décrites chez les mammifères comme les podocytes.

Bien que ces structures soient décrites dans la littérature, les observations ne permettent pas de mettre de manière nette tous ces éléments chez *N. furzeri*.

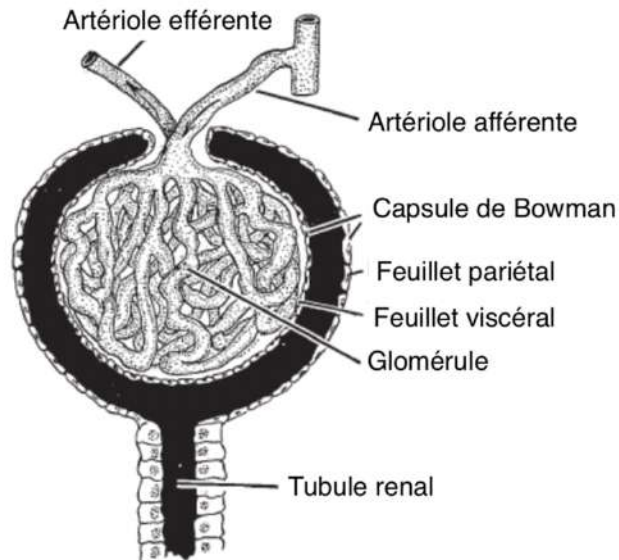


Figure 18 : Diagramme du glomérule rénal chez les téléostéens (Traduit depuis Perry 2011).

3. Tubes et système collecteur

Les glomérules sont poursuivis par le système de tubules proximaux et distaux, dont la distinction n'est pas toujours évidente, puis par des tubes collecteurs.

La première partie du tube proximal est assez large et constituée de cellules cubiques à prismatiques, dotées d'une importante bordure en brosse.

La seconde partie du tube proximal est la plus longue du néphron. Les cellules qui la composent possèdent une bordure en brosse moins dense que celle de la première partie. Ces parties sont impliquées dans les phénomènes de réabsorption. Les cellules épithéliales du tube distal sont également larges et cubiques à prismatiques mais ne possèdent pas de bordure en brosse (Figure 19). La transition entre le tube distal et les tubes collecteurs se fait progressivement puis ces tubes se déversent dans deux uretères qui fusionnent. A ce niveau, certains auteurs suggèrent l'existence d'une structure de type vessie sans qu'il existe un consensus (Perry 2011). Nous n'avons pas pu observer de vessie sur les coupes réalisées pendant cette thèse.

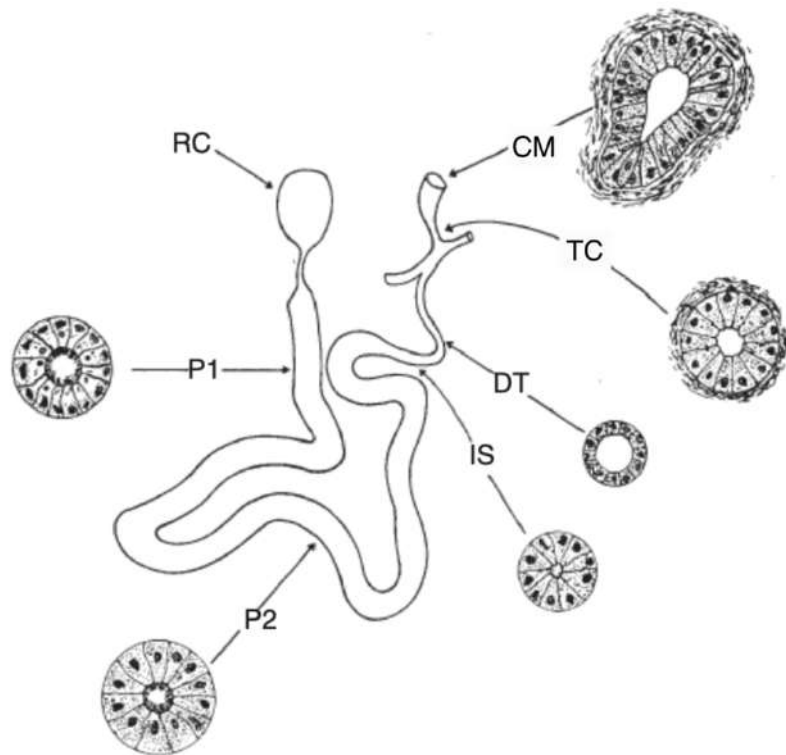


Figure 19 : Dessin schématique des tubules et tubes rénaux chez la truite, similaire à celui des autres poissons téléostéens (Perry 2011). (RC) corpuscule rénal, (P1, P2) tubules proximaux, (IS) segment intermédiaire, (DT) tubule distal, (TC) tube collecteur, (CM) canal mésonéphrotique

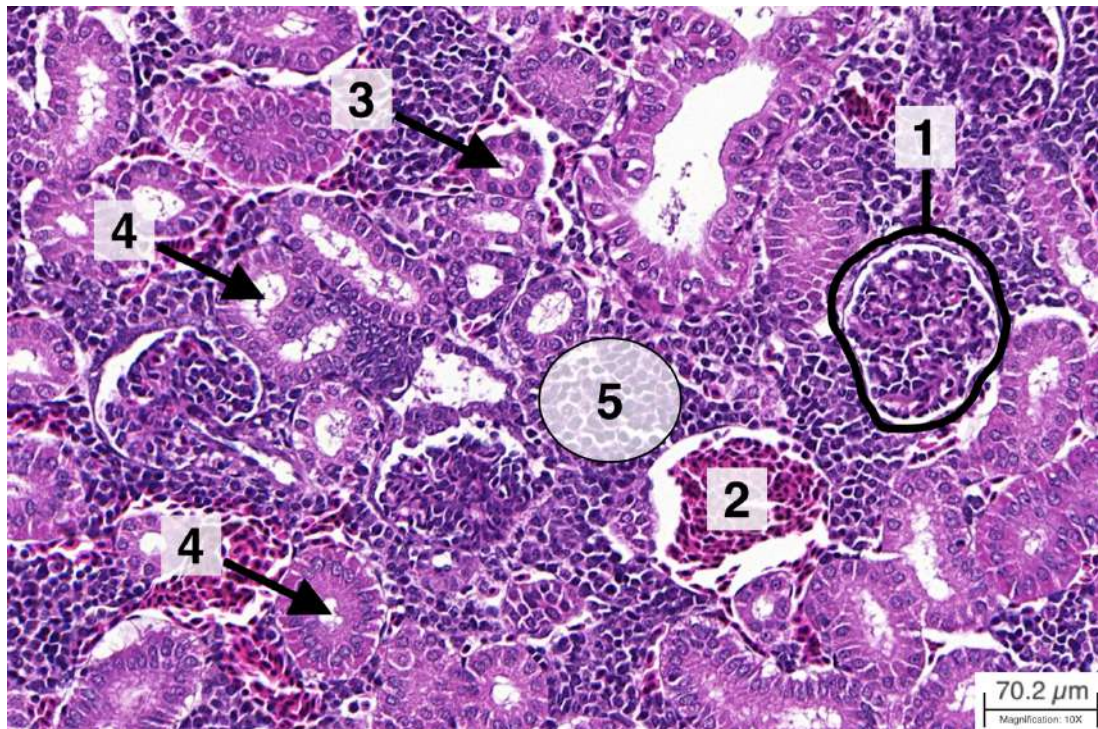


Illustration 24 : Vue générale du parenchyme rénale en coupe longitudinale chez N. furzeri mâle de 3 mois (HE). (1) glomérule, (2) érythrocytes dans un vaisseau sanguin, (3) tube distal, (4) tubes proximaux, (5) tissu hématopoïétique

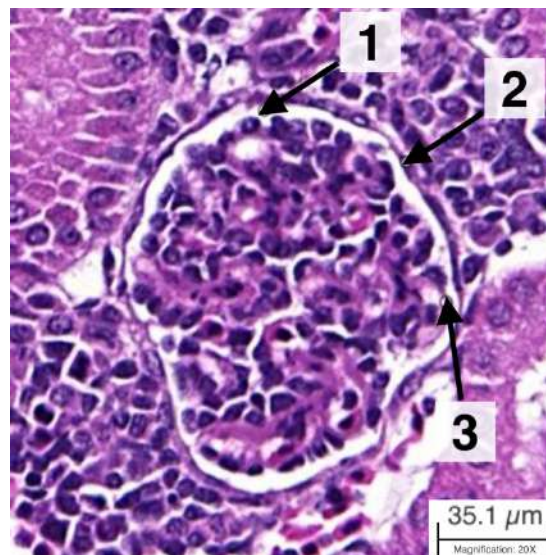


Illustration 25 : Vue rapprochée du glomérule rénal chez N. furzeri mâle de 3 mois en coupe longitudinale (HE). (1) espace de Bowman, (2) feuillet pariétal de la capsule de Bowman, (3) feuillet viscéral de la capsule de Bowman

I. **Système musculosquelettique**

1. Squelette axial

Le squelette axial se compose essentiellement du crâne, rigide, complexe, de la colonne vertébrale formée de vertèbres osseuses dont le nombre est inconstant et de la corde.

Les vertèbres thoraciques portent les côtes qui soutiennent les parois de la cavité abdominale.

Chez les ostéichtyens, dont *N. furzeri* fait partie, le crâne est majoritairement cartilagineux mais possède des ossifications endochondrales et de nombreux os dermiques, probablement dérivés des écailles.

À ces éléments s'ajoutent des ceintures squelettiques qui portent les nageoires, les arêtes et des os dermiques attachés aux vertèbres. Les nageoires sont des replis de peau soutenus par des rayons radiaux osseux. La ceinture pelvienne, assez simple, est reliée par l'intermédiaire d'une symphyse et se situe légèrement crânialement aux orifices uro-génitaux.

2. Os et cartilage

La structure microscopique des os des poissons est similaire à ceux des autres vertébrés. A l'inverse des mammifères, les poissons ne possèdent pas de tissu hématopoïétique intra-osseux. Il y a communément deux types d'os observés chez les poissons, du tissu osseux acellulaire ou cellulaire, c'est-à-dire composé d'ostéocytes. Le type cellulaire est le plus souvent rencontré chez les téléostéens inférieurs. Les téléostéens d'ordre supérieur, dont font partie les Cyprinodontiformes, et donc *N. furzeri*, possèdent généralement des os acellulaires caractérisés par l'absence d'ostéocytes. L'histogénèse osseuse prend donc deux formes :

- Une formation directe en association avec le derme
- Une formation indirecte via l'ossification périchondrale du cartilage hyalin.

Pour les os acellulaires, les ostéoblastes du périoste ne quittent pas leurs cavités et demeurent encapsulés. L'espace initialement occupé par les cellules est comblé par du matériel « osseux » correspondant essentiellement à du calcium et du phosphate (Mumford 2007).

Le **cartilage** est un tissu compact et résistant tout en étant plus flexible et moins dur que l'os. Il est composé pour l'essentiel par les chondrocytes qui sont logés dans une matrice extracellulaire (MEC) semi-rigide, riche en eau. Il ne possède ni innervation, ni vascularisation. Les chondrocytes sont dispersés et se retrouvent au cœur d'une lacune ou chondroplastes. Ces cellules, très actives, synthétisent les composants de la MEC (protéoglycanes, collagène et glycoprotéines) (Genten et al. 2010).

Le **pseudocartilage** est un tissu primitif qui ne possède que très peu de MEC et est typiquement avasculaire. Cela se traduit par un tissu constitué d'amas compacts de grandes cellules de forme ovale dont le cytoplasme est abondant. Les membranes des cellules sont en contact avec la MEC car il y a très peu de lacune (Genten et al. 2010).

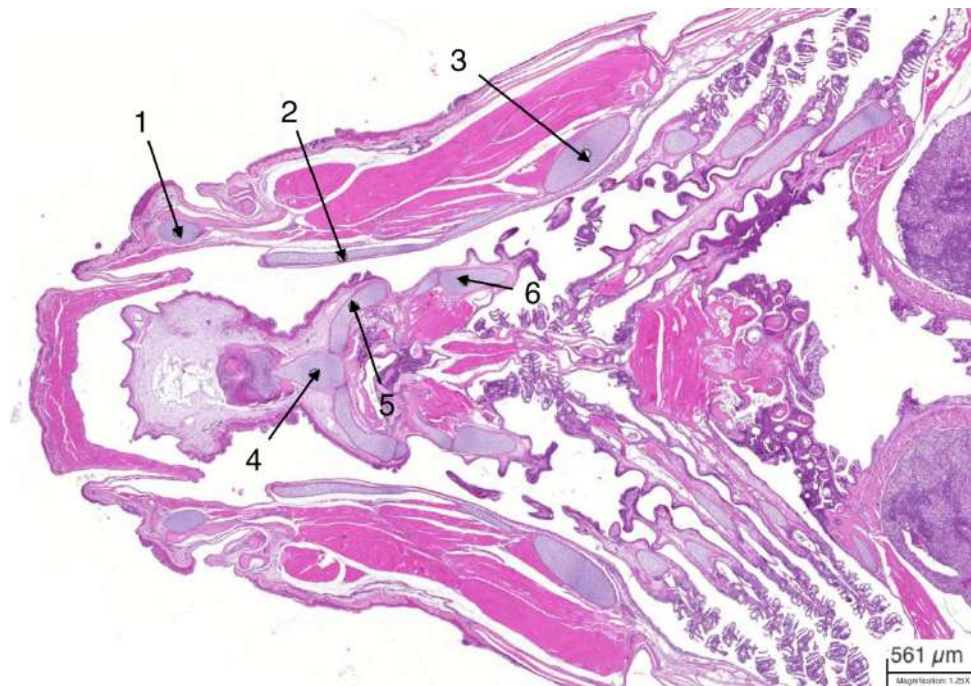
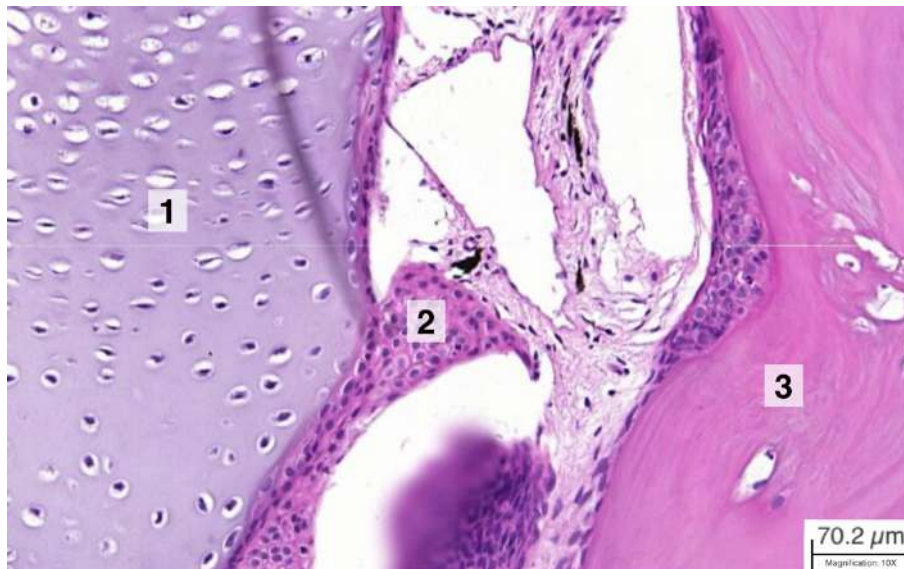


Illustration 26 : Histologie topographique indiquant les principaux axes cartilagineux du crâne de *N. furzeri* en coupe longitudinale, femelle de 3 mois (HE). (1) cartilage de Meckel, (2) « palatoquadrate cartilage », (3) cartilage hyosymplectique, (4) cartilage basibranchial, (5,6) arc ceratobranchial



*Illustration 27: Vue rapprochée des 3 tissus de soutien principaux, au niveau du crâne, chez *N. furzeri*, femelle de 7 mois, en coupe longitudinale (HE). (1) cartilage, (2) pseudocartilage, (3) os acellulaire*

3. Corde

Il s'agit d'un tissu de soutien qui se démarque de l'os et du cartilage d'un point de vue structurel. *N. furzeri*, qui est un vertébré, possède une notocorde, c'est-à-dire un axe longitudinal, flexible et incompressible qui longe ventralement le tube neural. La notocorde est entourée par une gaine cordale. Cette corde qui se forme à l'étape embryonnaire involue chez la plupart des tétrapodes mais chez les poissons, notamment les téléostéens dont *N. furzeri* fait partie, elle se réduit mais reste présente. Le plus souvent, la corde se retrouve étranglée par le développement des corps vertébraux et subsiste donc sous la forme de bourrelets tissulaires reliés entre eux par des ligaments (Genten et al. 2010).

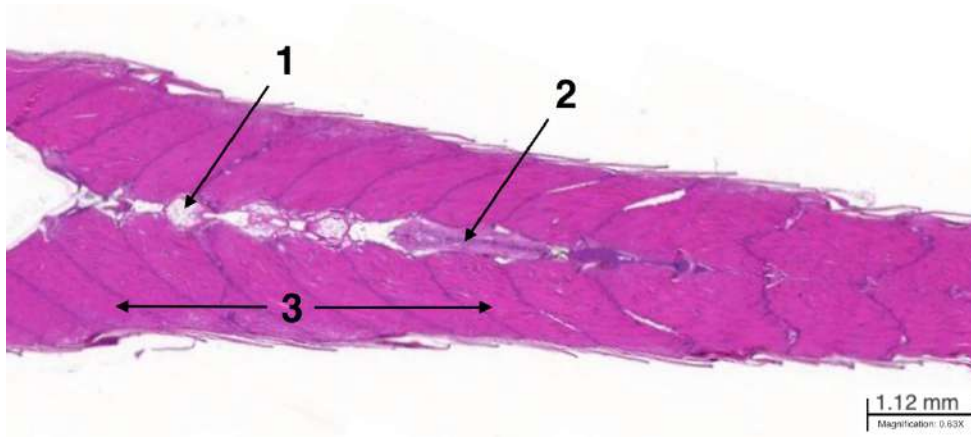


Illustration 28 : Histologie topographique de la notocorde en coupe longitudinale chez *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE). (1) notocorde, (2) moelle spinale, (3) muscles de la queue

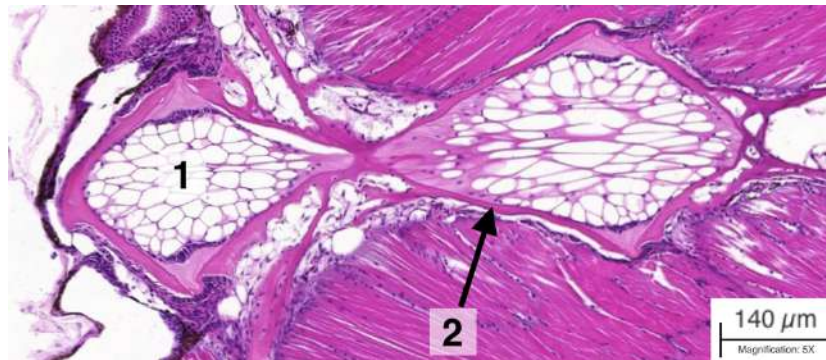


Illustration 29 : Vue rapprochée de la notocorde en coupe longitudinale chez *N. furzeri* mâle de 1 mois (HE). (1) notocorde, (2) tube périchordal osseux

4. Muscles

Les poissons, comme la plupart des vertébrés d'ordre supérieur possèdent 3 types musculaires : les muscles striés correspondant à la musculature « volontaire », les muscles cardiaques, striés mais involontaires, et les muscles lisses involontaires.

a) Muscles striés

Les muscles striés squelettiques sont majoritairement retrouvés au niveau du tronc et de la queue et leur contraction est à l'origine de la nage. Les muscles s'organisent en faisceaux musculaires appelés myomères et ces derniers sont à la fois séparés et maintenus entre eux par des cloisons de collagène inextensible, les myoseptas. Il y a autant de myomères que de vertèbres. Leurs cellules sont plurinucléées et contiennent plusieurs myofibrilles qui s'organisent en myofilaments (Genten, Terwinghe, Danguy 2010).

b) Muscle strié cardiaque

Les cardiomyocytes sont ramifiés et anastomosés, ne sont pas disposés parallèlement les uns aux autres. Ils ne possèdent qu'un noyau central, ou très exceptionnellement deux. Les cardiomyocytes de poissons sont comparativement deux fois plus petits que ceux des mammifères. Les fibres musculaires sont entourées par un réseau fin de tissu conjonctif (Genten et al. 2010)

c) Muscles lisses

Les muscles lisses, composés de léiomyocytes, sont retrouvés majoritairement au niveau des voies digestives, et ne possèdent pas de striations. Leurs cellules sont caractérisées par leur forme allongée et la présence en position centrale d'un unique noyau (Roberts, Ellis 2012). Ces muscles entourent également les artères et veines, la vessie natatoire ou encore les conduits génitaux (Genten et al. 2010).

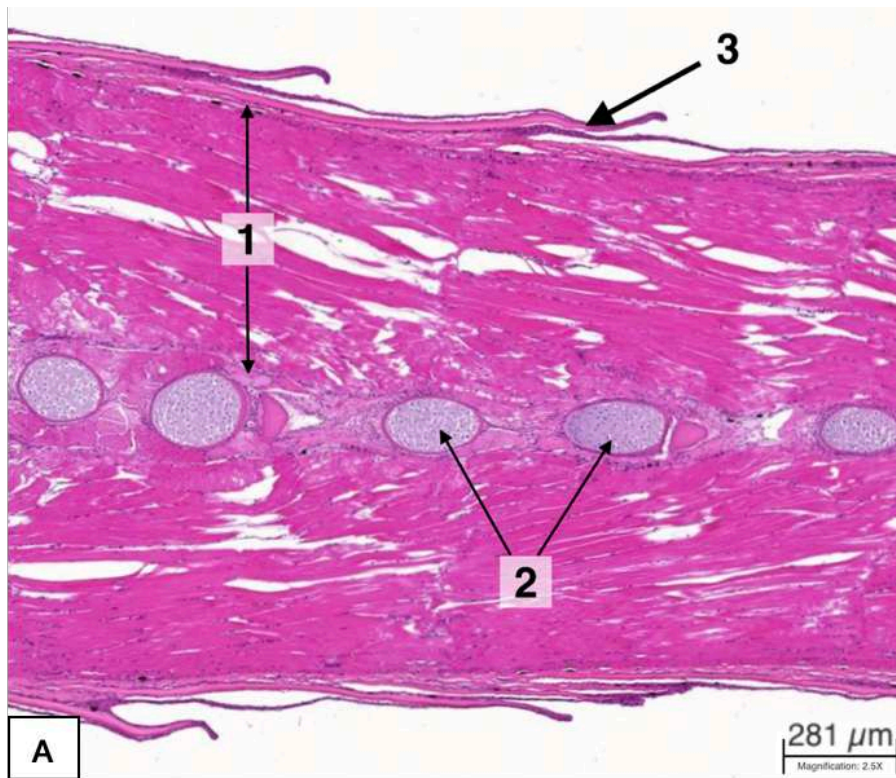


Illustration 30 : Coupe longitudinale de la queue de *N. furzeri* (HE), à moyen (A) et à faible grossissement (B). (1) vertèbre, (2) muscles striés squelettiques, (3) écaille.

J. Vessie natatoire

La vessie natatoire peut être définie comme étant un organe creux rempli de gaz issu du tractus digestif. Il s'agit d'un organe hydrostatique permettant l'équilibre du poisson dans une colonne d'eau (Pelster 2011).

Chez le *Nothobranchius*, les études de la vessie natatoire ont été rendues difficiles par la petite taille des structures et la facilité avec laquelle celle-ci se collapse. Cependant, plusieurs observations effectuées sur des individus d'âge différent ont permis de montrer qu'il n'existait pas de communication entre l'œsophage et la vessie natatoire faisant des *Nothobranchius* des physoclistes (Dyková et al. 2021).

La vessie natatoire des poissons du genre *Nothobranchius* se présente comme une simple cavité de forme ovoïde limitée dans sa partie crâniale par un épithélium simple prismatique, la glande à gaz, interconnecté à un réseau dense de capillaires (ou *rete mirabile*) (Dyková 2022). Cette glande permet chez les physoclistes d'ajuster le volume de gaz contenu dans la vessie natatoire à l'inverse des physostomes chez qui ce volume est ajusté par celui provenant de l'œsophage (Farrell et al. 2011). L'épithélium est alors est épaissi et étroitement lié au plexus capillaire qui permettent la pénétration du gaz dans la vessie natatoire (Genten et al. 2010). Le gaz contenu dans la vessie est essentiellement du dioxygène mais peut aussi être du dioxyde de carbone ou de l'azote.

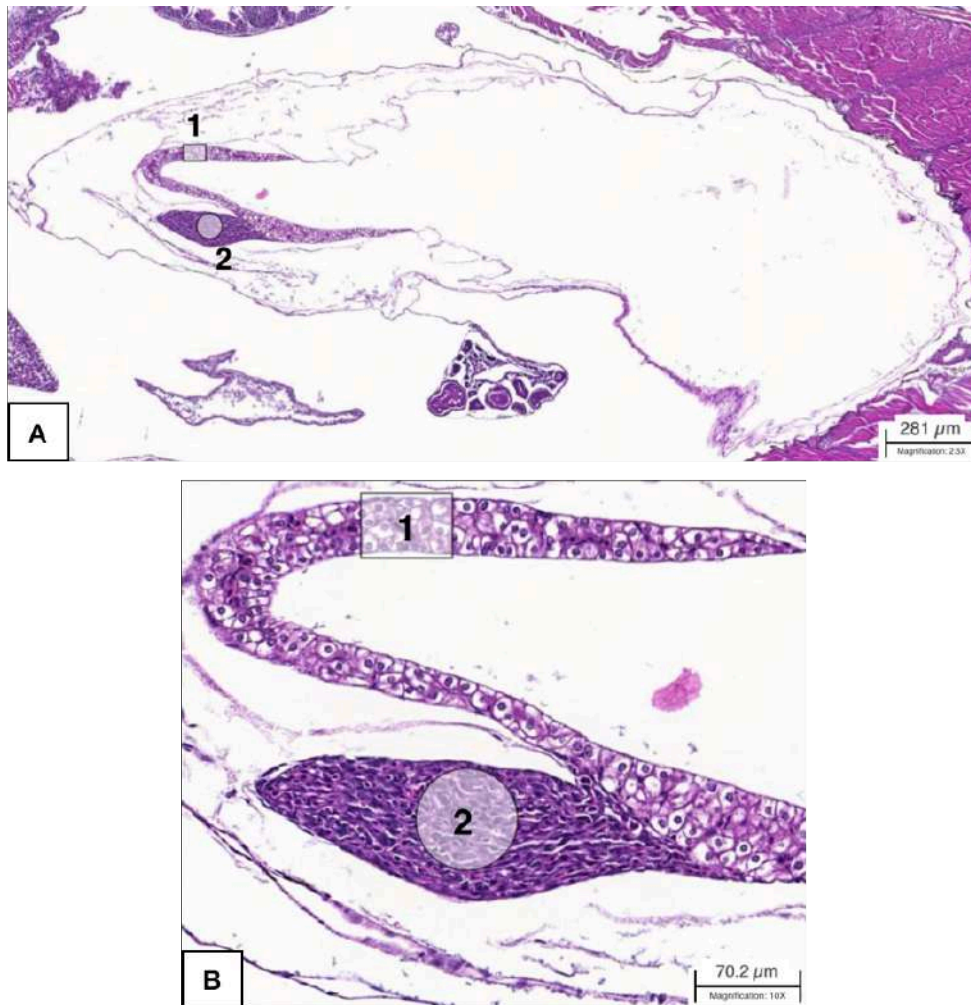


Illustration 31 : Vessie natatoire de N. furzeri, femelle de 1 mois en vue générale (A) et vue rapprochée de l'aspect crâniale (B) (HE). (1) épithélium simple prismatique composé de cellules sécrétrices, ou glande à gaz, (2) réseaux de capillaires (rete mirabele)

K. Œil

Il s'agit d'un organe sensoriel extrêmement complexe chez le poisson, impliqué comme chez les mammifères, dans la vision. Sa structure est comparable à celle des autres vertébrés, à quelques particularités près. Les yeux du *Nothobranchius* sont grands, latéraux et ne possèdent pas de paupières.

1. Tunique externe ou tunique fibreuse

Cette partie est formée par la sclère et la cornée qui sont en continuité.

La sclère constitue la partie postérieure de l'œil. Elle est constituée d'une couche épaisse de tissu conjonctif renforcée par une gaine cartilagineuse continue qui se présente comme une capsule autour de l'œil.

La cornée, quant à elle, est la partie antérieure du globe oculaire. Il s'agit d'une couche non pigmentée, avasculaire et richement innervée composée d'un épithélium pluristratifié non kératinisé limité antérieurement par une épaisse membrane : la membrane de Bowman.

2. Tunique moyenne ou uvée

Cette tunique constitue la tunique vasculaire de l'œil et elle comporte l'iris et la choroïde.

Le rôle de la choroïde est de fournir le sang aux photorécepteurs de la rétine.

L'iris peut être comparé à un diaphragme rigide séparant la chambre antérieure, contenant l'humeur aqueuse, du vitrée, dont l'orifice central est la pupille.

3. Tunique interne ou rétine

Cette dernière est la portion nerveuse de l'œil et est relativement épaisse. Généralement, elle est divisée en dix couches (Genten, Terwinghe, Danguy 2010) :

- L'épithélium pigmentaire de la rétine : couche monocellulaire la plus externe, et donc la plus proche de la choroïde de couleur brune à noire en microscopie.
- La couche des segments externes des photorécepteurs, constituée des cônes et bâtonnets qui sont les cellules nerveuses photosensibles et forment une mosaïque régulière en coupe tangentielle.
- La membrane limitante externe
- La couche des corps cellulaires des cônes et bâtonnets, aussi appelée la couche granuleuse externe
- La couche plexiforme externe
- La couche des corps cellulaires des cellules bipolaires et amacrines, ou, couche granuleuse interne.
- La couche plexiforme interne
- La couche des cellules ganglionnaires divisée en l'étage des corps cellulaires et celui des fibres
- La membrane limitante interne

4. Le cristallin

Le cristallin joue le rôle de lentille en permettant l'accommodation. Il se situe juste en arrière de la cornée. Il est entièrement recouvert par une capsule externe acellulaire en contact avec un épithélium cubique simple qui s'étend sur toute la surface du cristallin excepté une petite zone postérieure.



Illustration 32 : Vue générale de la topographie oculaire chez *N. furzeri*, mâle de 1 mois (HE).

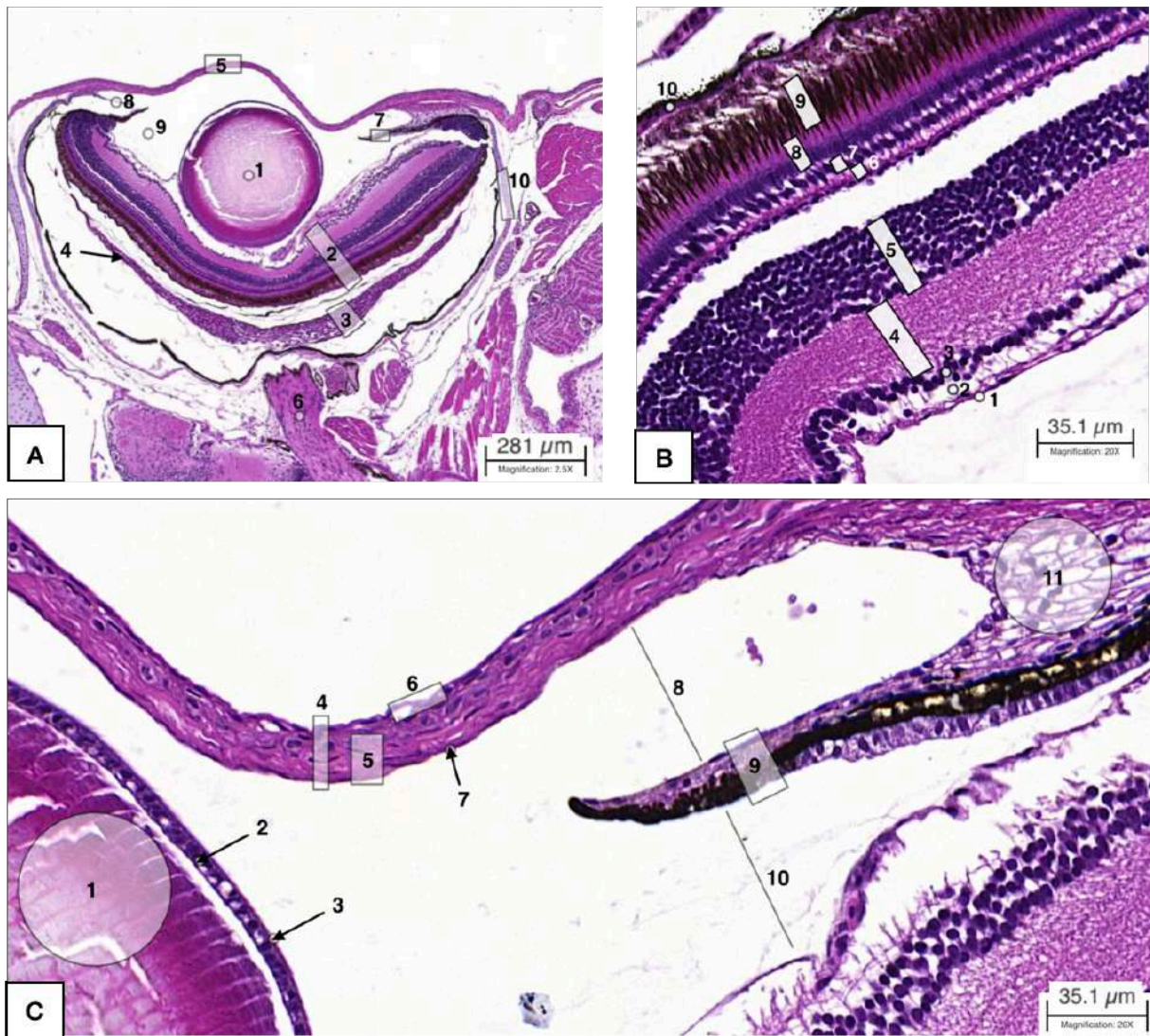


Illustration 33 : Œil de N. furzeri, femelle de 1 mois (HE).

A : Vue générale de l'œil : (1) cristallin, (2) rétine, (3,4) choroïde, (5) cornée, (6) nerf optique, (7) iris, (8) chambre antérieure remplie d'humeur aqueuse, (9) corps vitré, (10) sclère

B : Vue rapprochée des couches composant la rétine : (1) membrane limitante interne, (2) couche formée des fibres nerveuse, (3) couches des cellules ganglionnaires, (4) couche plexiforme interne, (5) couche nucléaire interne, (6) couche plexiforme externe, (7) couche nucléaire externe, (8) photorecepteurs, (9) épithélium pigmentaire, (10) choroïde

C : Vue rapprochée de l'aspect antérieur de l'œil : (1) fibres du cristallin, (2) épithélium cuboidal, (3) capsule acellulaire du cristallin, (4) cornée, (5) stroma cornéen, (6) membrane de Bowman, (7) endothélium cornéen, (8) chambre antérieure, humeur aqueuse, (9) iris, (10) corps vitré, (11) angle irido-cornéen

L. **Système nerveux**

Le système nerveux, qui coordonne l'activité des autres systèmes dans l'organisme, est composé du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Il dérive de l'ectoderme.

1. Cerveau

Les constituants du système nerveux central, l'encéphale et la moelle spinale, sont formés par la substance grise et la substance blanche. La substance grise concentre essentiellement les corps cellulaires des neurones et la substance blanche comporte les fibres nerveuses. Ces constituants sont protégés par des éléments cartilagineux ou osseux qui sont le crâne pour l'encéphale, et les vertèbres pour la moelle spinale. Ils sont tous deux entourés par les méninges.

L'encéphale des poissons comportent les mêmes éléments de base que ceux retrouvés chez les mammifères et est également divisé en quatre régions qui sont, dans la sens rostro-caudal (D'angelo 2013) (Figure 20) :

- Le télencéphale
- Le diencéphale
- Le mésencéphale
- Le rhombencéphale

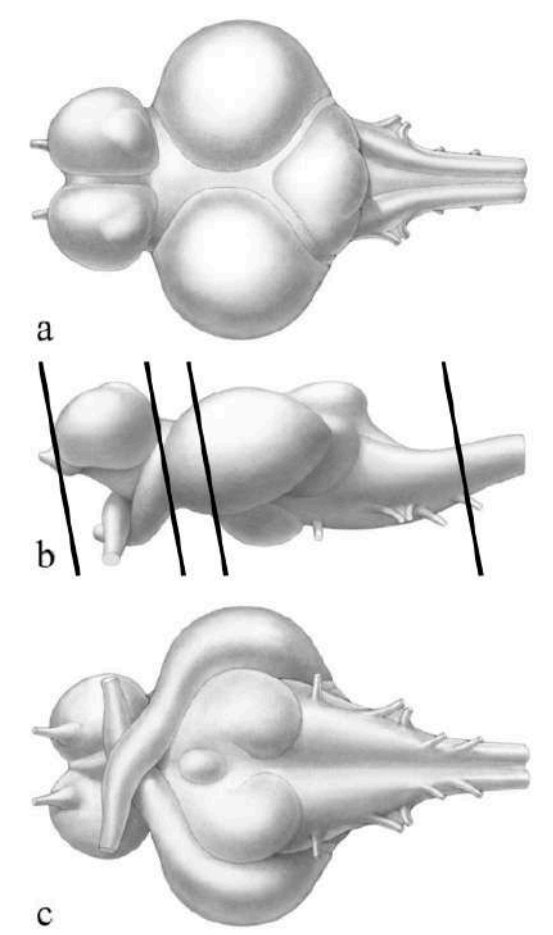


Figure 20 : Représentations de l'anatomie général du cerveau de N. furzeri en vue dorsale (a), latérale (b) et ventrale (c). Les lignes délimitent les différentes régions. (Modifié d'après D'angelo 2013).

Le télencéphale constitue la partie la plus rostrale du système nerveux central et comprend les bulbes olfactifs et les hémisphères télencéphaliques. Il est de taille relativement réduite par rapport aux mammifères et s'en distingue notamment par l'absence de néocortex.

Le diencéphale ne présente pas de frontières précises avec le télencéphale. Chez *N. furzeri*, il présente des subdivisions : aire pré-optique, epithalamus, thalamus, hypothalamus, région pré-tubérale, pretectum et le tractus optique.

Le mésencéphale de *N. fruzeri* présente deux régions facilement identifiables, le tectum optique et le tegmentum. Le tectum optique prend la forme de deux lobes larges et symétriques possédant une organisation en couches.

Le rhombencéphale représente la partie la plus caudale de l'encéphale. Il est limité rostralement par le tegmentum mésencéphalique et caudalement par la moelle spinale. Sa partie dorso-crâniale est constituée du cervelet puis le rhombencéphale se prolonge avec la moelle allongée ou *medulla oblongata* (D'angelo 2013).

Les éléments du système nerveux périphériques ne sont pas mis en évidence sur les lames numériques de N. furzeri réalisées pour cette étude.

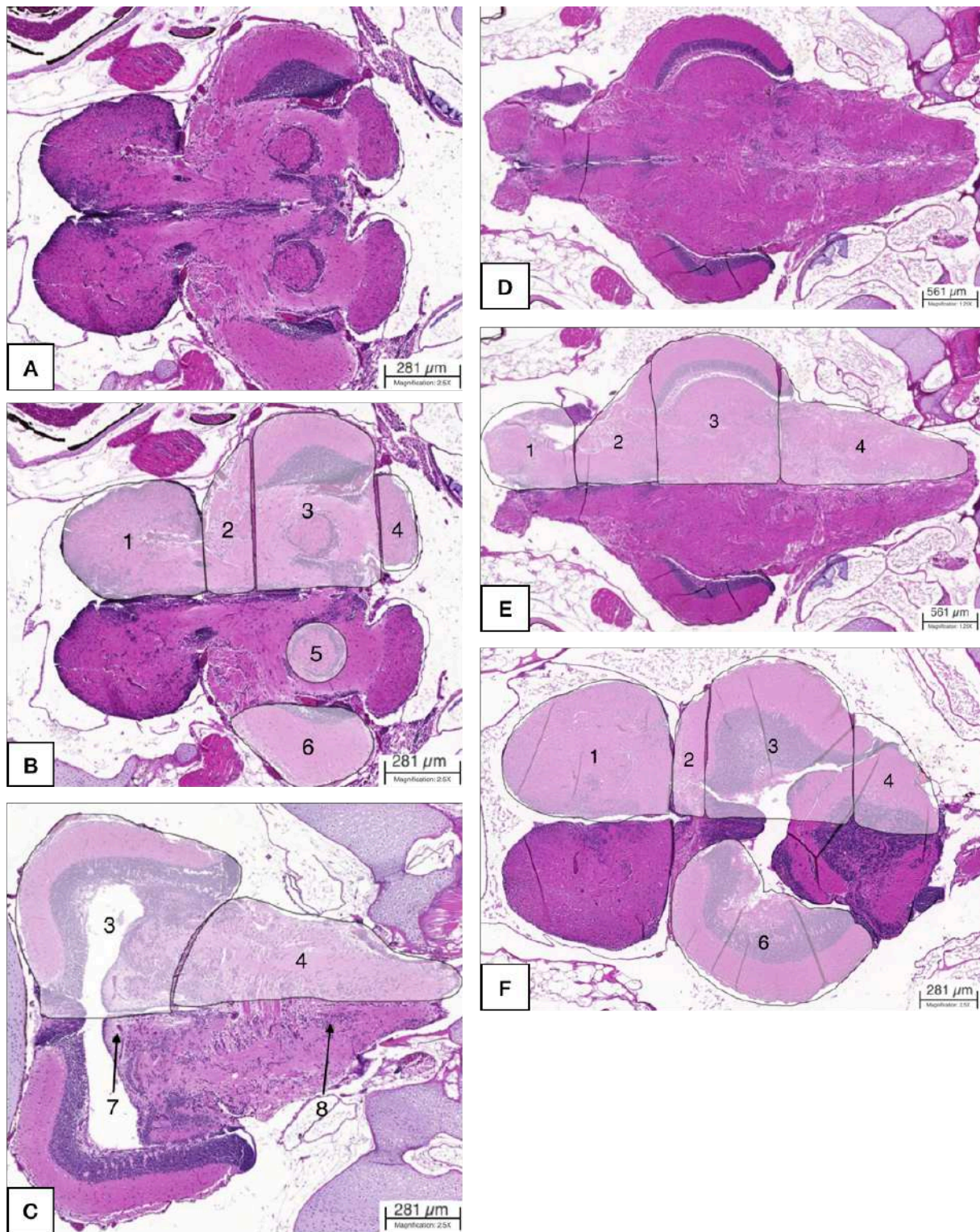


Illustration 34 : Encéphale de *N. furzeri*, coupes longitudinales chez un mâle de 1 mois (A, B, C) et de 5 mois (D, E, F) (HE). (1) télencéphale, (2) diencéphale, (3) mésencéphale, (4) rhombencéphale, (5) glomerular nucleus, (6) tectum optique, (7) cervelet, (8) medulla oblongata

2. Moelle spinale

La moelle spinale des téléostéens s'étend sur toute la longueur du corps et se termine, chez les téléostéens d'ordre supérieur, par un organe endocrine : l'urophyse. La substance grise est facilement distinguable de la substance blanche. Elle contient un grand nombre de motoneurones dans les cornes ventrales et dorsales (Roberts 2012).

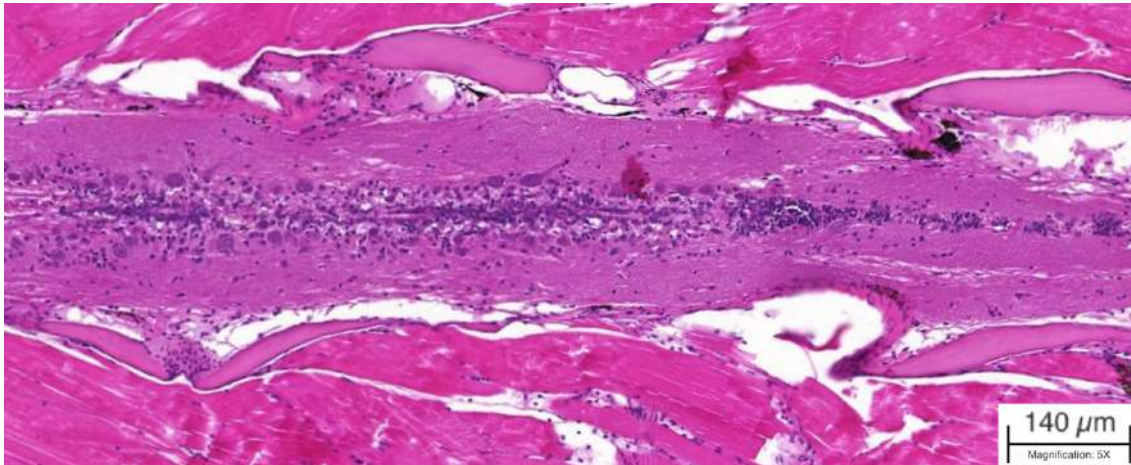


Illustration 35 : Vue rapprochée de la moelle spinale de N. furzeri femelle de 3 mois en coupe longitudinale (HE).

IV. Lames numériques annotées sur la plateforme de microscopie virtuelle

L'étude histologique sur les différents organes et tissus de *N. furzeri* présenté dans la partie précédente a été complété par un travail d'annotation sur lames numérisées et déposées sur une plateforme de microscopie virtuelle à l'ENVT. Cette plateforme est en accès restreint mais des exemples de lames annotées sont présentées ci-dessous.

La collection annotée sera ultérieurement déplacée sur une nouvelle plateforme accessible via un site web dédié pour un accès à la communauté scientifique. Elle pourra être complétée par d'autres lames et d'autres incidences de coupe de thèses vétérinaires ultérieures ou par des contributions d'autres équipes collaborant au sein du consortium en cours de structuration.

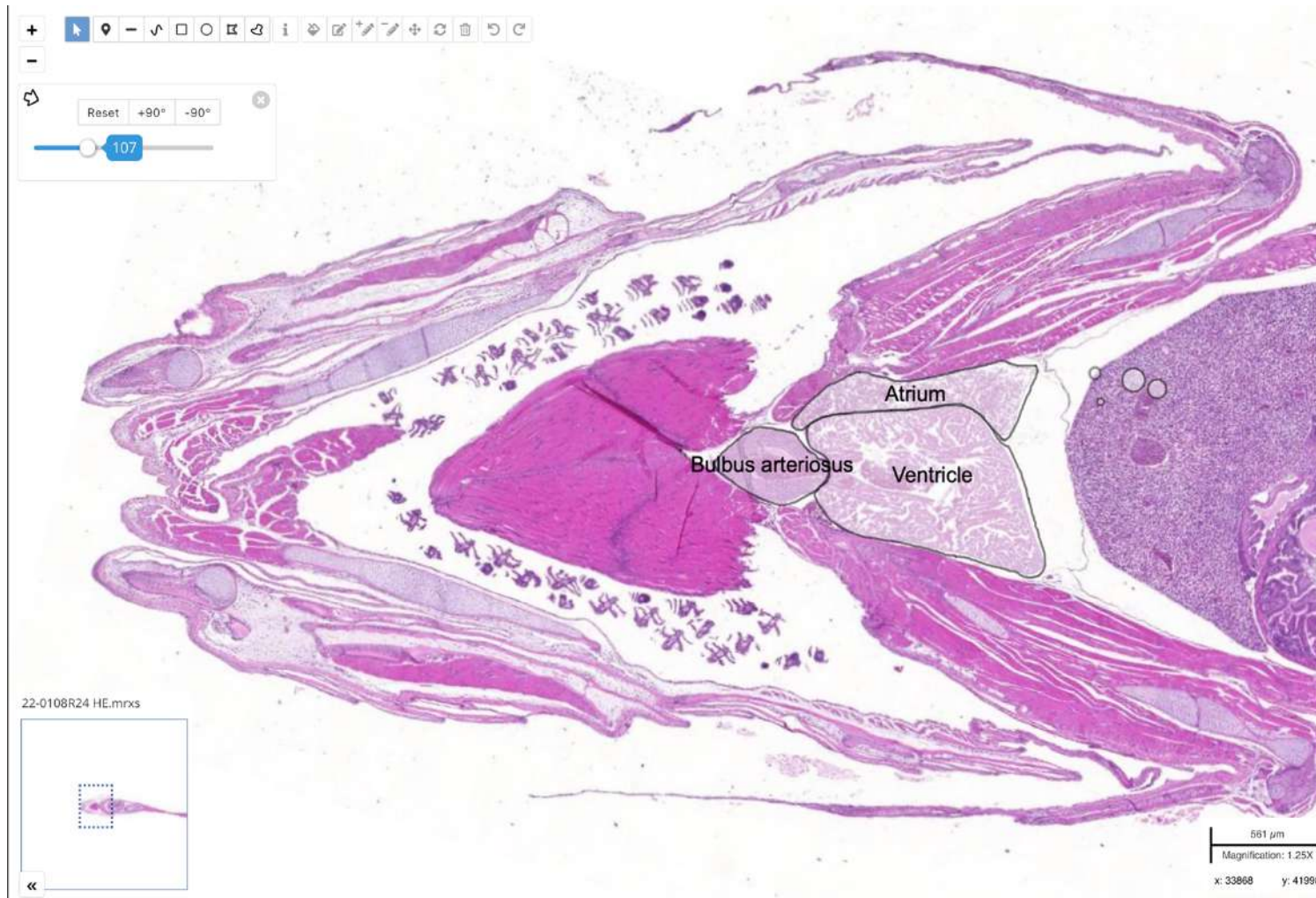


Figure 21 : Visuel sur Cytomine d'un cœur de N. furzeri

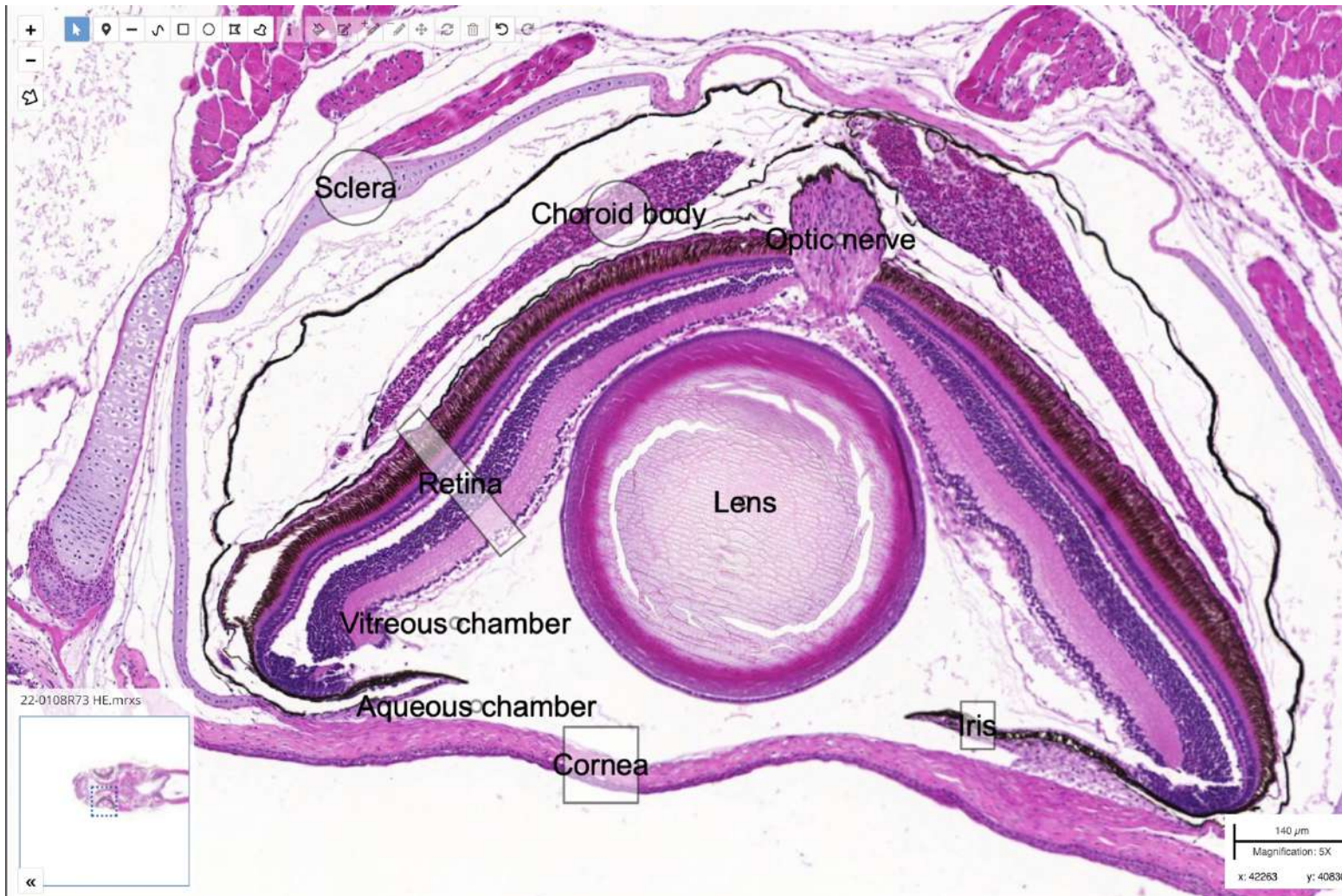


Figure 22 : Visuel sur Cytomine d'un œil de N. furzeri



Figure 23 : Visuel sur Cytomine des voies uro-génitales de N. furzeri

DISCUSSION & CONCLUSION

DISCUSSION

Cette thèse avait pour objectif de contribuer à la création d'une banque de prélèvements et de lames d'histologie de *N. Furzeri* afin de constituer un support aux recherches menées par au sein de l'institut Restore et de pouvoir ultérieurement répondre à différentes questions :

- Quelles sont les causes majeures du décès chez *nothobranchius* ? Sont-elles liés au disfonctionnement d'un seul organe ou plutôt multiorganique ?
- Existe-il un ordre d'apparition des disfonctions organiques ?
- Peut-on décrire un dimorphisme sexuel lié aux lésions tissulaires ?
- Est-ce que des tissus néoplasiques sont mis en évidence au fil du vieillissement ?
- Une différence histopathologique est-elle observable au cours du vieillissement entre les souches GRZ et MZM pouvant expliquer, ou non, leur différence de durée de vie ?

Dans ce contexte, le travail réalisé jusqu'à ce jour représente près de 1400 légendes sur 150 lames numérisées de poissons mâles et femelles âgés de 1 à 8 mois. Dans un premier temps, seuls les poissons ne présentant pas d'anomalie histologique majeure ont été retenus et légendés. Il convient effectivement de d'abord caractériser un tissu avant d'en évaluer les éventuelles variations lésionnelles. Nos observations confirment et enrichissent celles déjà réalisées au cours d'une première étude sur le sujet (Dyková 2022).

D'autre part, cette étude expérimentale a permis de mettre au point la partie matériels et méthodes à l'origine de la création de l'atlas. Entre autre, nous avons pu valider une technique de fixation et de coupe des tissus quel que soit l'âge, puis fixer le nombre de coupes nécessaires pour avoir une vision suffisamment précise des différents organes tout en essayant d'économiser du temps de préparation des lames et d'anticiper les coupes nécessaires aux futures études. Il faut noter que cette étape technique de création des lames histologiques est relativement chronophage car de très nombreuses coupes sont réalisées et plusieurs processus rentrent en jeu, de la mise en bloc de paraffine des poissons à la numérisation des lames colorées. Ces étapes s'étalent souvent sur plusieurs jours à plusieurs semaines. En effet, l'échelonnement des coupes est nécessaire afin d'effectuer des contrôles visuels sous microscope permettant d'attester de la bonne qualité des coupes et colorations et de surveiller l'apparition d'éventuelles lésions.

Ce suivi de découpe a permis de sélectionner les individus inclus dans l'étude ce jour et d'en rejeter un certain nombre. Effectivement, il est essentiel dans un premier temps de disposer d'images représentant des tissus sains. Ces éléments sont l'une des raisons pour lesquelles le projet actuel n'a pas pu bénéficier du nombre initialement souhaité de poissons. Les poissons ayant été exclus sont ceux chez lesquels des anomalies histologiques majeures ont été révélées. Ces anomalies peuvent être apparues de leur vivant, notamment des tumeurs ou abcès, ou post-mortem, ou peuvent être liées à un défaut de fixation, conservation de l'échantillon ou encore présenté des défauts ou artéfacts de coloration. Il faut cependant souligner le fait qu'il est extrêmement difficile de s'affranchir de toute anomalie. En effet, la littérature mentionne que certains tissus, dont les branchies et les intestins, subissent une autolyse bien plus rapidement que d'autres tissus (Mumford 2007) et le poisson n'est pas une exception. Ce phénomène est également observé chez certains *nothobranchius* de notre étude. Pour ces poissons, seules les parties préservées ont été annotées pour enrichir malgré tout la banque de données dans l'attente d'échantillons plus satisfaisants.

Au-delà des poissons exclus, notre collection a également été limitée par le nombre d'individus présents et disponibles dans les locaux de l'institut RESTORE. D'une part, l'élevage de *N. furzeri* était débutant pour cette espèce au début de ce travail de thèse et il se contruit encore avec une reproduction moins aisée que ce que les publications récentes rapportent. D'autre part, les poissons, encore peu nombreux par rapport aux capacités d'accueil, sont inclus à d'autres projets de recherche en cours et tous ne peuvent donc être sacrifiés au profit de la création de l'atlas.

Ensuite, cette seconde partie de thèse n'est constituée que de coupes longitudinales ventro-dorsales. Or, la description exhaustive des tissus nécessite des coupes sur tous les plans anatomiques, donc transversale, sagittale et longitudinales. Ce travail sera donc implémenté de ces plans de coupes supplémentaires, à nouveau pour les individus des 2 sexes, à tous les âges et issus des deux fonds génétiques. Plus tôt, nous avons mentionné le fait de réaliser plus lames par niveau de coupe. Cela a pour intérêt de caractériser au mieux les tissus avec des colorations pouvant marquer spécifiquement certaines cellules. La laboratoire d'histopathologie a la possibilité d'utiliser, entre autres, l'acide periodique Schiff qui révèle le glycogène, et la

coloration trichromique de Masson qui met en évidence les tissus conjonctifs (*cartilage, collagène, tissu fibreux*).

Dans ce travail préliminaire, seule la coloration de base Hématoxyline-éosine a été utilisée car elle permet de produire une image complète de la microanatomie des tissus et c'est la coloration usuelle utilisée par les pathologistes et chercheurs afin de faire une évaluation initiale. Les colorations ainsi réalisées, la reconnaissance des tissus a ensuite en partie reposée sur un article particulièrement intéressant, parut en très récemment et ayant déjà abordé le sujet (Dyková 2022). Malgré cela, les objectifs de ce travail gardent du sens car il n'existe pas de bibliographie hormis cet article qui ne décrit pas les évolutions des organes et tissus au cours de la vie de *N. furzeri*. La description et l'annotation des lames numérisées a été réalisée à la lumière de la bibliographie relative à d'autres poissons téléostéens d'ordre supérieur. Certaines informations se vérifient chez *N. furzeri* mais d'autres restent encore à confirmer et à explorer. En effet, certains organes, notamment les organes sensoriels ou les organes lymphoïdes, ne sont pas encore observés ou seulement partiellement observés au cours de cette étude. Le système vasculaire reste encore à caractériser tout comme le système nerveux périphérique. Malgré tout, les organes majeurs commencent à être bien connus et les études à venir enrichiront ces premières données.

Enfin, l'un des objectifs principaux de ce projet est que cet atlas puisse profiter à l'ensemble de la communauté scientifique, d'où l'intérêt d'avoir travaillé sur une plateforme de microscopie virtuelle collaborative des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises. L'objectif est à court terme de pouvoir mettre en ligne en open accès cet atlas via un site web et une plateforme de microscopie virtuelle afin que l'ensemble des chercheurs intéressés par le *nothobranchius* puisse consulter cet atlas, à titre d'ouvrage de référence et que certains chercheurs appartenant à la communauté de *N. furzeri* (consortium en cours) puissent y ajouter leurs lames et des annotations sur l'ensemble de la collection co-construite.

CONCLUSION

Cette thèse présente une première contribution fondatrice à la constitution d'un atlas complet, interactif et évolutif concernant l'histologie et l'histopathologie de *Nothobranchius furzeri* tout au long de sa vie. Cet atlas, qui se veut à terme exhaustif, sera lui-même un support pédagogique mais surtout une banque de données scientifique ouverte utilisable dans d'autres études ayant pour sujet ou pour composante l'histologie de *N. furzeri*. En effet, l'élaboration de l'atlas constitue dans un premier temps l'analyse factuelle des images mais des études portant sur l'évolution des tissus en fonction de l'âge et du sexe pourront prendre comme support ce travail une fois celui-ci achevé par l'ajout des images manquantes. Il reste encore une lourde charge de travail mais les perspectives ouvertes par *N. furzeri* dans le domaine des gérosiences ne cessent de croître.

La faible espérance de vie de ce petit vertébré, ses nombreuses similarités avec l'homme, et la facilité de manipulation de son génome sont autant de caractéristiques qui placent ce nouveau modèle animal comme un modèle pertinent en gérosiences.

L'apparition de *N. furzeri* dans les études sur le vieillissement est encore assez récente (2003), mais des zootechnies du monde entier en font maintenant l'élevage comme l'institut Restore en région Occitanie. La recherche n'en est qu'au début des études utilisant ce modèle et ces études sont amenées à se multiplier dans les prochaines années car le vieillissement en santé représente un enjeu socioéconomique majeur. Cet atlas pourrait alors devenir un site de référence.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Aquatic Pathobiology Laboratory [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://aquaticpath.epi.ufl.edu/fhm>

ANAGNOSTOPOULOS, Gerasimos, MONTÉGUT, Léa, CHEN, Hui, CARBONNIER, Vincent, MARTINS, Isabelle, MANGANE, Khady, MANNIOUI, Abdelkrim, BOIS, Alex, BARACCO, Elisa Elena, MAIURI, Maria Chiara et KROEMER, Guido, 2021. Chapter 10 - Immunoblot-based assays for assessing autophagy in the turquoise killifish *Nothobranchius furzeri*. In : KEPP, Oliver et GALLUZZI, Lorenzo (éd.), *Methods in Cell Biology* [en ligne]. Academic Press. pp. 123-138. Monitoring Vesicular Trafficking in Cellular Responses to Stress - Part B. [Consulté le 27 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X20301904>

AUNAN, J. R., WATSON, M. M., HAGLAND, H. R. et SØREIDE, K., 2016. Molecular and biological hallmarks of ageing. *BJS (British Journal of Surgery)*. 2016. Vol. 103, n° 2, pp. e29-e46. DOI 10.1002/bjs.10053.

BAUMGART, Mario, DI CICCIO, Emiliano, ROSSI, Giacomo, CELLERINO, Alessandro et TOZZINI, Eva Terzibasi, 2015. Comparison of captive lifespan, age-associated liver neoplasias and age-dependent gene expression between two annual fish species: *Nothobranchius furzeri* and *Nothobranchius korthause*. *Biogerontology*. février 2015. Vol. 16, n° 1, pp. 63-69. DOI 10.1007/s10522-014-9535-y.

BETANCUR-R, Ricardo, BROUGHTON, Richard E., WILEY, Edward O., CARPENTER, Kent, LÓPEZ, J. Andrés, LI, Chenhong, HOLCROFT, Nancy I., ARCILA, Dahiana, SANCIANGCO, Millicent, CURETON II, James C., ZHANG, Feifei, BUSER, Thaddaeus, CAMPBELL, Matthew A., BALLESTEROS, Jesus A., ROA-VARON, Adela, WILLIS, Stuart, BORDEN, W. Calvin, ROWLEY, Thaine, RENEAU, Paulette C., HOUGH, Daniel J., LU, Guoqing, GRANDE, Terry, ARRATIA, Gloria et ORTÍ, Guillermo, 2013. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS currents*. 18 avril 2013. Vol. 5, pp. ecurrents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288. DOI 10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288.

BLAŽEK, Radim, POLAČIK, Matej et REICHARD, Martin, 2013. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo*. 4 septembre 2013. Vol. 4, n° 1, pp. 24. DOI 10.1186/2041-9139-4-24.

BONNET, Carole, CAMBOIS, Emmanuelle et FONTAINE, Roméo, 2021. Dynamiques, enjeux démographiques et socioéconomiques du vieillissement dans les pays à longévité élevée. *Population*. 2021. Vol. 76, n° 2, pp. 225-325. DOI 10.3917/popu.2102.0225.

BRUNET, Anne, 2020a. Old and new models for the study of human ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. septembre 2020. Vol. 21, n° 9, pp. 491-493. DOI 10.1038/s41580-020-0266-4.

BRUNET, Anne, 2020b. Development of the African Killifish as a New Model to Study Aging and Suspended animation. *Innovation in Aging*. 1 décembre 2020. Vol. 4, n° Supplement_1, pp. 743. DOI 10.1093/geroni/igaa057.2668.

CELLERINO, Alessandro, VALENZANO, Dario R. et REICHARD, Martin, 2016. From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*. 2016. Vol. 91, n° 2, pp. 511-533. DOI 10.1111/brv.12183.

CHILDS, Bennett G., GLUSCEVIC, Martina, BAKER, Darren J., LABERGE, Remi-Martin, MARQUESS, Dan, DANANBERG, Jamie et VAN DEURSEN, Jan M., 2017. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews. Drug Discovery*. octobre 2017. Vol. 16, n° 10, pp. 718-735. DOI 10.1038/nrd.2017.116.

CHISTIYAKOV, Dimitry A., SOBENIN, Igor A., REVIN, Victor V., OREKHOV, Alexander N. et BOBRYSHV, Yuri V., 2014. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014, pp. 238463. DOI 10.1155/2014/238463.

COHEN, Alan A., KENNEDY, Brian K., ANGLAS, Ulrich, BRONIKOWSKI, Anne M., DEELEN, Joris, DUFOUR, Frédérik, FERBEYRE, Gerardo, FERRUCCI, Luigi, FRANCESCHI, Claudio, FRASCA, Daniela, FRIGUET, Bertrand, GAUDREAU, Pierrette, GLADYSHEV, Vadim N., GONOS, Efstathios S., GORBUNOVA, Vera, GUT, Philipp, IVANCHENKO, Mikhail, LEGAULT, Véronique, LEMAÎTRE, Jean-François, LIONTIS, Thomas, LIU, Guang-Hui, LIU, Mingxin, MAIER, Andrea B., NÓBREGA, Otávio T., OLDE RIKKERT, Marcel G. M., PAWELEC, Graham, RHEAULT, Sylvie, SENIOR, Alistair M., SIMM, Andreas, SOO, Sonja, TRAA, Annika, UKRAINTSEVA, Svetlana, VANHAELEN, Quentin, VAN RAAMSDONK, Jeremy M., WITKOWSKI, Jacek M., YASHIN, Anatoliy I., ZIMAN, Robert et FÜLÖP, Tamás, 2020. Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1 octobre 2020. Vol. 191, pp. 111316. DOI 10.1016/j.mad.2020.111316.

D'ANGELO, Livia, 2013. Brain Atlas of an Emerging Teleostean Model: *Nothobranchius furzeri*. *The Anatomical Record*. 2013. Vol. 296, n° 4, pp. 681-691. DOI 10.1002/ar.22668.

DE SOUTO BARRETO, Philipe, GUYONNET, S., ADER, I., ANDRIEU, S., CASTEILLA, L., DAVEZAC, N., DRAY, C., FAZILLEAU, N., GOURDY, P., LIBLAU, R., PARINI, A., PAYOUX, P., PÉNICAUD, L., RAMPON, C., ROLLAND, Y., VALET, P., VERGNOLLE, N., VELLAS, B., et INSPIRE PROGRAM GROUP, 2021. The Inspire Research Initiative: A

Program for Geroscience and Healthy Aging Research going from Animal Models to Humans and the Healthcare System. *The Journal of Frailty & Aging*. 1 avril 2021. Vol. 10, n° 2, pp. 86-93. DOI 10.14283/jfa.2020.18.

DI CICCIO, Emiliano, TOZZINI, Eva Terzibasi, ROSSI, Giacomo et CELLERINO, Alessandro, 2011. The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Experimental Gerontology*. 1 avril 2011. Vol. 46, n° 4, pp. 249-256. DOI 10.1016/j.exger.2010.10.011.

DUFOUR, Frédéric, 2021. *Étude de la dérégulation des systèmes physiologiques durant le vieillissement ; Approche bio-informatique*.

DYKOVÁ, I., J. ČÁK, REICHARD, M., SOUČKOVÁ, K., SLABÝ, O. et BLÁEK, R., 2021. Swim bladder as a primary site of mycobacterial infection in *Nothobranchius* ‘belly sliders’. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1 juillet 2021. Vol. 145, pp. 111-117. DOI 10.3354/dao03601.

DYKOVÁ, Iva-Zak, 2022. Histology of major organ systems of *Nothobranchius* fishes: short-lived model species. *Journal of Vertebrate Biology*. 21 février 2022. Vol. Vol. 71, n° Vol. 71, pp. 1(50).

ENJIN, Anders et SUH, Greg Seong-Bae, 2013. Neural Mechanisms of Alarm Pheromone Signaling. *Molecules and Cells*. 31 mars 2013. Vol. 35, n° 3, pp. 177-181. DOI 10.1007/s10059-013-0056-3.

FÄNGE, R. et NILSSON, S., 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia*. 1 février 1985. Vol. 41, n° 2, pp. 152-158. DOI 10.1007/BF02002607.

FARRELL, Anthony P, DON STEVENS, E, CECH, Joseph J et RICHARDS, Jeffrey J, 2011. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. [en ligne]. 2011. [Consulté le 12 juillet 2023]. Disponible à l'adresse : <https://univ-scholarvox-com.gorgone.univ-toulouse.fr/reader/docid/88809662>

FERRUCCI, Luigi, COOPER, Rachel, SHARDELL, Michelle, SIMONSICK, Eleanor M., SCHRACK, Jennifer A. et KUH, Diana, 2016. Age-Related Change in Mobility: Perspectives From Life Course Epidemiology and Geroscience. *The Journals of Gerontology: Series A*. 1 septembre 2016. Vol. 71, n° 9, pp. 1184-1194. DOI 10.1093/gerona/glw043.

FURNESS, Andrew I., 2016. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biological Reviews*. 2016. Vol. 91, n° 3, pp. 796-812. DOI 10.1111/brv.12194.

GENTEN, Franck, TERWINGHE, Eddy et DANGUY, André, 2010. *Histologie illustrée du poisson*. Versailles : Quae. Savoir faire. ISBN 978-2-7592-0863-0. M 22514

GONÇALVES, Rafaella Silva dos Santos Aguiar, MACIEL, Álvaro Campos Cavalcanti, ROLLAND, Yves, VELLAS, Bruno et DE SOUTO BARRETO, Philipe, 2022. Frailty

biomarkers under the perspective of geroscience: A narrative review. *Ageing Research Reviews*. 1 novembre 2022. Vol. 81, pp. 101737. DOI 10.1016/j.arr.2022.101737.

GORBUNOVA, Vera, SELUANOV, Andrei, MAO, Zhiyong et HINE, Christopher, 2007. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol. 35, n° 22, pp. 7466-7474. DOI 10.1093/nar/gkm756.

GUERVILLE, Florent, DE SOUTO BARRETO, P., ADER, I., ANDRIEU, S., CASTEILLA, L., DRAY, C., FAZILLEAU, N., GUYONNET, S., LANGIN, D., LIBLAU, R., PARINI, A., VALET, P., VERGNOLLE, N., ROLLAND, Y. et VELLAS, B., 2020. Revisiting the Hallmarks of Aging to Identify Markers of Biological Age. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 1 janvier 2020. Vol. 7, n° 1, pp. 56-64. DOI 10.14283/jpad.2019.50.

GUILBAUD, Axel, MAILLIEZ, Aurélie et BOULANGER, Éric, 2020. Vieillesse. *médecine/sciences*. 2020. Vol. 36, n° 12, pp. 1173. DOI 10.1051/medsci/2020224.

GUYONNET, Sophie, ROLLAND, Y., TAKEDA, C., OUSSET, P.-J., ADER, I., DAVEZAC, N., DRAY, C., FAZILLEAU, N., GOURDY, P., LIBLAU, R., PARINI, A., PAYOUX, P., PÉNICAUD, L., RAMPON, C., VALET, P., VERGNOLLE, N., ANDRIEU, S., DE SOUTO BARRETO, P., CASTEILLA, L., VELLAS, B., et INSPIRE PLATFORM GROUP, 2021. The INSPIRE Bio-Resource Research Platform for Healthy Aging and Geroscience: Focus on the Human Translational Research Cohort (The INSPIRE-T Cohort). *The Journal of Frailty & Aging*. 1 avril 2021. Vol. 10, n° 2, pp. 110-120. DOI 10.14283/jfa.2020.38.

HERTWIG, Stefan T., 2008. Phylogeny of the Cyprinodontiformes (Teleostei, Atherinomorpha): the contribution of cranial soft tissue characters. *Zoologica Scripta*. 2008. Vol. 37, n° 2, pp. 141-174. DOI 10.1111/j.1463-6409.2007.00314.x.

HU, Chi-Kuo et BRUNET, Anne, 2018. The African turquoise killifish: A research organism to study vertebrate aging and diapause. *Aging Cell*. 2018. Vol. 17, n° 3, pp. e12757. DOI 10.1111/acel.12757.

HUDSON, Robert B, O'NEILL, Greg, MCCUTCHEON, Megan, ANGEL, Jacqueline J. et APPLEBAUM, Robert A., 2013. The Longevity Dividend: Geroscience Meets Geropolitics. *Public Policy and aging report*. 2013. Vol. 23, n° 4.

HUGHES, Lily C., ORTÍ, Guillermo, HUANG, Yu, SUN, Ying, BALDWIN, Carole C., THOMPSON, Andrew W., ARCILA, Dahiana, BETANCUR-R., Ricardo, LI, Chenhong, BECKER, Leandro, BELLORA, Nicolás, ZHAO, Xiaomeng, LI, Xiaofeng, WANG, Min, FANG, Chao, XIE, Bing, ZHOU, Zhuocheng, HUANG, Hai, CHEN, Songlin, VENKATESH, Byrappa et SHI, Qiong, 2018. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii)

based on transcriptomic and genomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 juin 2018. Vol. 115, n° 24, pp. 6249-6254. DOI 10.1073/pnas.1719358115.

KEALY, Richard D., LAWLER, Dennis F., BALLAM, Joan M., MANTZ, Sandra L., BIERY, Darryl N., GREELEY, Elizabeth H., LUST, George, SEGRE, Mariangela, SMITH, Gail K. et STOWE, Howard D., 2002. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 mai 2002. Vol. 220, n° 9, pp. 1315-1320. DOI 10.2460/javma.2002.220.1315.

KENNEDY, Brian K., BERGER, Shelley L., BRUNET, Anne, CAMPISI, Judith, CUERVO, Ana Maria, EPEL, Elissa S., FRANCESCHI, Claudio, LITHGOW, Gordon J., MORIMOTO, Richard I., PESSIN, Jeffrey E., RANDO, Thomas A., RICHARDSON, Arlan, SCHADT, Eric E., WYSS-CORAY, Tony et SIERRA, Felipe, 2014. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*. 6 novembre 2014. Vol. 159, n° 4, pp. 709-713. DOI 10.1016/j.cell.2014.10.039.
KUDRYASHOVA, Ksenia S., BURKA, Ksenia, KULAGA, Anton Y., VOROBYEVA, Nataliya S. et KENNEDY, Brian K., 2020. Aging Biomarkers: From Functional Tests to Multi-Omics Approaches. *PROTEOMICS*. 2020. Vol. 20, n° 5-6, pp. 1900408. DOI 10.1002/pmic.201900408.

LEES, Hayley, WALTERS, Hannah et COX, Lynne S., 2016. Animal and human models to understand ageing. *Maturitas*. 1 novembre 2016. Vol. 93, pp. 18-27. DOI 10.1016/j.maturitas.2016.06.008.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos, BLASCO, Maria A., PARTRIDGE, Linda, SERRANO, Manuel et KROEMER, Guido, 2013. The hallmarks of aging. *Cell*. 6 juin 2013. Vol. 153, n° 6, pp. 1194-1217. DOI 10.1016/j.cell.2013.05.039.

LUCAS-SÁNCHEZ, Alejandro, ALMAIDA-PAGÁN, Pedro Francisco, MENDIOLA, Pilar et DE COSTA, Jorge, 2013. Notoobranchius as a model for aging studies. A review. *Aging and Disease*. 7 décembre 2013. Vol. 5, n° 4, pp. 281-291. DOI 10.14336/AD.2014.0500281.

MAZZETTO, Mariateresa, CATERINO, Cinzia, GROTH, Marco, FERRARI, Elisa, REICHARD, Martin, BAUMGART, Mario et CELLERINO, Alessandro, 2022. RNAseq Analysis of Brain Aging in Wild Specimens of Short-Lived Turquoise Killifish: Commonalities and Differences With Aging Under Laboratory Conditions. *Molecular Biology and Evolution*. 1 novembre 2022. Vol. 39, n° 11, pp. msac219. DOI 10.1093/molbev/msac219.

MCKENZIE, Brennen A., 2022. Comparative veterinary geroscience: mechanism of molecular, cellular, and tissue aging in humans, laboratory animal models, and companion dogs and cats. *American Journal of Veterinary Research* [en ligne]. 2022. Vol. 83, n° 6. [Consulté le 10 avril 2023]. DOI 10.2460/ajvr.22.02.0027. Disponible à l'adresse : <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/83/6/ajvr.22.02.0027.xml>

- MEDVEDEV, Zhores A., 1990. An Attempt at a Rational Classification of Theories of Ageing. *Biological Reviews*. 1990. Vol. 65, n° 3, pp. 375-398. DOI 10.1111/j.1469-185X.1990.tb01428.x.
- MITCHELL, Sarah J., SCHEIBYE-KNUDSEN, Morten, LONGO, Dan L. et DE CABO, Rafael, 2015. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2015. Vol. 3, pp. 283-303. DOI 10.1146/annurev-animal-022114-110829.
- NEAR, Thomas J., EYTAN, Ron I., DORNBURG, Alex, KUHN, Kristen L., MOORE, Jon A., DAVIS, Matthew P., WAINWRIGHT, Peter C., FRIEDMAN, Matt et SMITH, W. Leo, 2012. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 août 2012. Vol. 109, n° 34, pp. 13698-13703. DOI 10.1073/pnas.1206625109.
- NG'OMA, Enoch, GROTH, Marco, RIPA, Roberto, PLATZER, Matthias et CELLERINO, Alessandro, 2014. Transcriptome profiling of natural dichromatism in the annual fishes *Nothobranchius furzeri* and *Nothobranchius kadleci*. *BMC Genomics*. 2 septembre 2014. Vol. 15, n° 1, pp. 754. DOI 10.1186/1471-2164-15-754.
- OMS, 2015. Rapport mondial sur le vieillissement et la santé. [en ligne]. 2015. [Consulté le 19 avril 2023]. Disponible à l'adresse : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206556/?sequence=1>
- PARENTI, Lynne R., 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the AMNH* ; v. 168, article 4. [en ligne]. 1981. [Consulté le 3 juillet 2023]. Disponible à l'adresse : <http://hdl.handle.net/2246/438>
- PLATZER, Matthias et ENGLERT, Christoph, 2016. *Nothobranchius furzeri*: A Model for Aging Research and More. *Trends in Genetics*. 1 septembre 2016. Vol. 32, n° 9, pp. 543-552. DOI 10.1016/j.tig.2016.06.006.
- POLAČIK, M., DONNER, M. T. et REICHARD, M., 2011. Age structure of annual *Nothobranchius* fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? *Journal of Fish Biology*. mars 2011. Vol. 78, n° 3, pp. 796-809. DOI 10.1111/j.1095-8649.2010.02893.x.
- POLAČIK, M. et REICHARD, M., 2010. Diet overlap among three sympatric African annual killifish species *Nothobranchius* spp. from Mozambique. *Journal of Fish Biology*. 29 juin 2010. pp. no-no. DOI 10.1111/j.1095-8649.2010.02717.x.
- POLAČIK, Matej et REICHARD, Martin, 2009. Indirect Fitness Benefits Are Not Related to Male Dominance in a Killifish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2009. Vol. 63, n° 10, pp. 1427-1435.

POUCH, Lola, [sans date]. IHU : Toulouse crée son institut dédié à la prévention, au vieillissement en santé et aux gérosiences. *Université Toulouse III - Paul Sabatier* [en ligne]. [Consulté le 20 octobre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.univ-tlse3.fr/la-recherche/ihu-toulouse-cree-son-institut-dedie-a-la-prevention-au-vieillissement-en-sante-et-aux-gerosciences>

Projet INSPIRE – soyez acteurs du bien vieillir, [sans date]. *INSPIRE* [en ligne]. [Consulté le 20 octobre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://inspire.chu-toulouse.fr/fr/>

REICHARD, M., POLAČIK, M. et SEDLÁČEK, O., 2009. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *Journal of Fish Biology*. 2009. Vol. 74, n° 1, pp. 198-212. DOI 10.1111/j.1095-8649.2008.02129.x.

REICHARD, Martin, 2015. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution - Google Livres. [en ligne]. 2015. [Consulté le 7 juillet 2023]. Disponible à l'adresse : <https://books.google.fr/books>

REICHARD, Martin et POLAČIK, Matej, 2019. *Nothobranchius furzeri*, an « instant » fish from an ephemeral habitat. KING, Stuart RF et RODGERS, Peter A (éd.), *eLife*. 8 janvier 2019. Vol. 8, pp. e41548. DOI 10.7554/eLife.41548.

REUTER, Hanna, KRUG, Johannes, SINGER, Peter et ENGLERT, Christoph, 2018. The African turquoise killifish *Nothobranchius furzeri* as a model for aging research. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 1 mars 2018. Vol. 27, pp. 15-22. DOI 10.1016/j.ddmod.2018.12.001.

ROBERTS, R.j. et ELLIS, A.e., 2012. The Anatomy and Physiology of Teleosts. In : *Fish Pathology* [en ligne]. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 17-61. [Consulté le 22 juillet 2023]. ISBN 978-1-118-22294-2. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118222942.ch2>

ROBERTS, Ronald J., 2012. *Fish Pathology*. John Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-22296-6.
ROBERTS, Sally, COLOMBIER, Pauline, SOWMAN, Aneka, MENNAN, Claire, RÖLFING, Jan H. D., GUICHEUX, Jérôme et EDWARDS, James R., 2016. Ageing in the musculoskeletal system. *Acta Orthopaedica*. décembre 2016. Vol. 87, n° sup363, pp. 15-25. DOI 10.1080/17453674.2016.1244750.

SIERRA, Felipe, 2016. The Emergence of Geroscience as an Interdisciplinary Approach to the Enhancement of Health Span and Life Span. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 1 avril 2016. Vol. 6, n° 4, pp. a025163. DOI 10.1101/cshperspect.a025163.

SIERRA, Felipe, 2019. Geroscience and the challenges of aging societies. *Aging Medicine*. 10 octobre 2019. Vol. 2, n° 3, pp. 132-134. DOI 10.1002/agm2.12082.

SIERRA, Felipe et VELLAS, Bruno, 2021. Inspire: A New Effort on Geroscience in Toulouse, France. *Innovation in Aging*. 17 décembre 2021. Vol. 5, n° Suppl 1, pp. 298. DOI 10.1093/geroni/igab046.1159.

STEINEL, Natalie C. et BOLNICK, Daniel I., 2017. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 2017. Vol. 8. [Consulté le 18 octobre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00827>

TERZIBASI, Eva, VALENZANO, Dario Riccardo, BENEDETTI, Mauro, RONCAGLIA, Paola, CATTANEO, Antonino, DOMENICI, Luciano et CELLERINO, Alessandro, 2008. Large Differences in Aging Phenotype between Strains of the Short-Lived Annual Fish *Nothobranchius furzeri*. *PLOS ONE*. 4 décembre 2008. Vol. 3, n° 12, pp. e3866. DOI 10.1371/journal.pone.0003866.

TERZIBASI TOZZINI, Eva et CELLERINO, Alessandro, 2020. *Nothobranchius* annual killifishes. *EvoDevo*. 15 décembre 2020. Vol. 11, n° 1, pp. 25. DOI 10.1186/s13227-020-00170-x.

TROPIS, Clémence, CATENACCI, Marie, VALET, Philippe et DRAY, Cédric, 2021. Modifications du tissu adipeux au cours du vieillissement. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 1 mars 2021. Vol. 15, n° 2, pp. 142-148. DOI 10.1016/j.mmm.2021.01.010.

VALENZANO, Dario Riccardo, ABOOBAKER, Aziz, SELUANOV, Andrei et GORBUNOVA, Vera, 2017. Non-canonical aging model systems and why we need them. *The EMBO Journal*. 13 avril 2017. Vol. 36, n° 8, pp. 959-963. DOI 10.15252/embj.201796837.

VALENZANO, Dario Riccardo, BENAYOUN, Bérénice A., SINGH, Param Priya, ZHANG, Elisa, ETTER, Paul D., HU, Chi-Kuo, CLÉMENT-ZIZA, Mathieu, WILLEMSSEN, David, CUI, Rongfeng, HAREL, Itamar, MACHADO, Ben E., YEE, Muh-Ching, SHARP, Sabrina C., BUSTAMANTE, Carlos D., BEYER, Andreas, JOHNSON, Eric A. et BRUNET, Anne, 2015. The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell*. 3 décembre 2015. Vol. 163, n° 6, pp. 1539-1554. DOI 10.1016/j.cell.2015.11.008.

VAN DEURSEN, Jan M., 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 22 mai 2014. Vol. 509, n° 7501, pp. 439-446. DOI 10.1038/nature13193.

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G. et GAGE, F. H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews. Neuroscience*. décembre 2000. Vol. 1, n° 3, pp. 191-198. DOI 10.1038/35044558.

VITE, Charles H. et HEAD, Elizabeth, 2014. Aging in the canine and feline brain. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. novembre 2014. Vol. 44, n° 6, pp. 1113-1129. DOI 10.1016/j.cvsm.2014.07.008.


WOURMS, John P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 1972. Vol. 182, n° 3, pp. 389-414. DOI 10.1002/jez.1401820310.

WILSON, J.M. & CASTRO, L.F.C. : Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: Grosell, M., Farrell, A.P. & Brauner, C.J. (eds.), *The multifunctional gut of fish*. Elsevier, 2010

YONKOS, L.T., FISHER, D.J., REIMSCHUESSEL, R., and KANE, A.S. 2000. Atlas of fathead minnow normal histology. University of Florida

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de fixation, décalcification et mise en blocs de paraffine des *N. furzeri*

	Protocole de fixation, décalcification et mise en blocs de paraffine des <i>Nothobranchius furzeri</i>	RESTORE 07.07.2023 (v1)
---	---	--------------------------------------

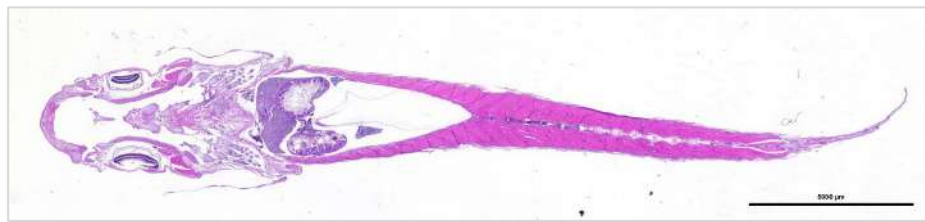
FIXATION des ECHANTILLONS :

- 🐟 Fixation au formol à 10% tamponné à la neutralité de qualité histologique à température ambiante.
- 🐟 Les individus sont immergés immédiatement / le plus rapidement après la mort dans un grand volume de fixateur (un volume de tissu pour 9 volumes de fixateur).
- 🐟 La durée de fixation est de 48h.
- 🐟 Il est possible de diminuer le temps de fixation des individus fins et de petite taille de moitié.



DECALCIFICATION :

- 🐟 Après 48h de fixation, les poissons sont rapidement rincés au PBS 1X (3 immersions suivies et rapides) plus transférés dans une solution d'EDTA à 10% à l'étude à 37°C pendant 10 jours
- 🐟 Les contenant de solution d'EDTA sont agités 30 secondes chaque jour. La solution d'EDTA est changée au bout de 5 jours.
- 🐟 Rinçage à l'eau avant de faire partir dans l'automate d'imprégnation en paraffine (cycle de 15 heures toute la nuit).
- 🐟 Mise en bloc à la station d'enrobage.



1/1

Annexe 2 : Cytomine ENVT

ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE NOTHOBRANCHIUS FURZERI : UN NOUVEAU MODÈLE ANIMAL DANS L'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT COMPARÉ

LEPORI Manon

Nothobranchius furzeri est un nouveau modèle dans l'étude du vieillissement. L'histologie de ce poisson, dont l'évolution des tissus au cours du temps est peu connue et décrite, représente une approche pertinente pour ce type d'étude. La première partie de cette thèse, bibliographique, présente ce modèle et justifie son intérêt dans l'étude du vieillissement. La deuxième partie, expérimentale, a été menée en collaboration avec l'équipe 2 de l'institut RESTORE qui a fourni les individus de l'étude. Des lames histologiques réalisées sur des poissons des 2 sexes et d'âge variant de 1 à 8 mois ont été numérisées et annotées sur la plateforme Cytomine. Le manuscrit vise à décrire l'histologie des différents organes et tissus afin de constituer un atlas histologique de référence de *Nothobranchius* pouvant servir de support aux études utilisant ce modèle. Cet atlas, sur lames numériques, doit pouvoir être rendu disponible à la consultation pour la communauté scientifique. Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet INSPIRE, mené en Occitanie depuis 2019, dont l'objectif est de définir des marqueurs histologiques et biologiques du vieillissement.

Mots clés : *Nothobranchius furzeri*, African killifish, modèle, vieillissement, gérosceince, inspire

HISTOLOGICAL STUDY OF NOTHOBRANCHIUS FURZERI : A NEW ANIMAL MODEL IN AGING STUDIES

Nothobranchius furzeri is a new animal model in aging studies. This fish histology, that is neither very well known nor described, represents a relevant approach for this kind of study. The first, bibliographic, part of the thesis presents the model and justifies its use in aging studies. The second, experimental part has been completed with team 2 of RESTORE institute that gave all the fishes used in the study. Histological slides were created for the two genders and for different age, between 1 and 8 months, individuals. The slides are scanned and annotated on the Cytomine web-based platform. The ambition of this manuscript is to describe the organs and tissues histology in order to create an histological atlas of *Nothobranchius* that could be considered as a reference work for researches using this model. This atlas, on digital slides, should be accessible for consultation for scientific community. This work takes part of the INSPIRE project which is driven in Occitanie since 2019. The main objective is to identify histological and biological markers of aging.

Key words : *Nothobranchius furzeri*, African killifish, model, aging, geroscience, inspire

TOULOUSE 2023